

**Einfluß der Glykosphingolipide auf die Zell-Zell
Wechselwirkung:
Synthese multivalenter Glykokonjugate zum
Auffinden von Kohlenhydratbindestellen**

Dissertation
zur Erlangung
des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

von
Thomas Lütgert
aus Hamm

Marburg 1997

Die vorliegende Arbeit wurde vom Februar 1993 bis zum Mai 1997 im Arbeitskreis von Prof. Dr. H. Wiegandt am Institut für Physiologische Chemie, Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg, erstellt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 1997 angenommen.

Erstgutachter:	Prof. Dr. H. Wiegandt
Zweitgutachter:	Prof. Dr. H. Kindl
Tag der mündlichen Prüfung:	

Abkürzungen

Cer	Ceramid
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE-	Diethylaminoethyl-
DHU	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fuc	Fukose, Fukosyl-
Gal	Galaktose, Galaktosyl-
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin(yl-)
Glc	Glukose, Glukosyl-
GlcNAc	N-Acetylglukosamin(yl-)
GSL	Glykosphingolipid
HBL	human brain lectin
HIV	human immunodeficiency virus
HPTLC	high-performance thin layer chromatography
Man	Mannose
NHS	N-Hydroxysuccinimid
	(N-Hydroxy-2,5-dioxopyrrolididon)
p.A.	pro analysis
pH	potentia hydrogenii
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Pyr.	Pyridin
rpm	revolutions per minute
Rt	Raumtemperatur
ü.N.	über Nacht
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

Nomenklatur einzelner GSL bzw. Kohlenhydrate nach IUPAC-IUB (1),
 die Ganglioside sind der Nomenklatur von Wiegandt (2) folgend
 abgekürzt worden:

Le ^x	Galβ1->4[Fucα1->3]GlcNAcβ1->R
LacCer	Galβ1->4Glc->Cer
Sgal1	I ³ SO ₃ -Gal-Cer
globo H	[Fucα1->2]Galβ1-4GbOse ₄ -Cer
Gtet1	IV ³ NeuAc-GgOse ₄ -Cer
Glac1	II ³ NeuAc-Lac-Cer
Glac2	II ³ (NeuAc) ₂ -Lac-Cer
Gtri2	II ³ (NeuAc) ₂ -GgOse ₃ -Cer
Gtet2b	II ³ (NeuAc) ₂ -GgOse ₄ -Cer
Gfpt1	IV ² Fuc-, II ³ NeuAc-GgOse ₄ -Cer

1. EINLEITUNG

Polysaccharide sind, ähnlich wie Nukleinsäuren und Proteine, Biopolymere.

Homopolymere Polysaccharide agieren meist als Energiespeicher (Glukagen, Stärke) oder Gerüstsubstanzen (Cellulose, Chitin, Pektine) eines Organismus'. Strukturell sind Polysaccharide oft aufgrund der mannigfaltigen Verknüpfungsmöglichkeiten schwer zu untersuchen.

Polysaccharide mit komplexeren Kohlenhydratsequenzen liegen oft frei (3,4), größtenteils jedoch an Trägermoleküle gebunden vor.

Die Kohlenhydratketten liegen dabei zum Teil an Proteine geknüpft als Glykoproteine oder als Glykolipide vor, wenn die Oligosaccharidstruktur von einem Lipid getragen wird.

Obwohl Glykoproteine und Glykolipide in Aufbau und Biosynthese wenig gemeinsam (5-7) haben, gibt es in den Kohlenhydratketten von Glykoproteinen und Glykolipiden teilweise identische terminale Strukturen (8-10). Die Existenz von monoklonalen Antikörpern, die mit diesen Kohlenhydratepitopen kreuzreagieren (11), läßt jedoch funktionelle Gemeinsamkeiten vermuten.

So liegt die Vermutung nahe, daß die Sequenz der Monosaccharide, ihre Verknüpfung und ihre Konformation eine Information beinhaltet, über die man bislang noch wenig weiß.

Glykoproteine und Glykolipide sind so in der Plasmamembran lokalisiert, daß die Kohlenhydratkette in den interzellulären Raum ragt (12,13). Sie befinden sich also an strategisch wichtiger Stelle für die Signalübermittlung. In der Tat belegen zahlreiche Studien, daß Glykolipide die Signalübertragung entscheidend beeinflussen (siehe zum Überblick (14)).

Desweiteren haben die komplexen Kohlenhydrate oft Eigenschaften tumor-spezifischer Antigene, d.h. in zahlreichen Fällen ist eine Korrelation zwischen der Struktur der Polysaccharide und der Karzinomart gefunden worden (Übersicht in (8,15)).

Bei der Betrachtung von Kohlenhydraten ist es fast nicht möglich, die Lektine unerwähnt zu lassen:

Lektine sind ursprünglich Proteine aus Pflanzen (16-29), die sich durch eine Spezifität für jeweils eine bestimmte Kohlenhydratstruktur auszeichnen. Sie entstammen nicht dem Immunsystem, haben mindestens zwei Kohlenhydratbindestellen, die zum Teil kovalent teils nichtkovalent verbunden sind (30). Dadurch sind diese Moleküle in der Lage, Zellen zu agglutinieren und/oder Glykokonjugate zu präzipitieren (31).

Aus fast jedem Organismus ist inzwischen ein Molekül isoliert worden (16,24,32-39), das zwar nach der genetischen und der daraus folgenden Strukturhomologie ein Lektin ist, aber auf das die obige Definition nicht ganz paßt. Daher soll **eine** Kohlenhydratbindestelle ausreichen, und die Fähigkeit zur Agglutination soll nicht mehr zwingend notwendig sein, damit ein Molekül in die Klasse der Lektine gehört. Vielmehr werden nach dieser Definition alle kohlenhydratbindenden Moleküle mit Ausnahme der Antikörper und der Enzyme als "Lektin" bezeichnet (40).

Zum Teil sind die Lektine in die Zellmembran integriert oder an sie assoziiert (17,24). So können diese Moleküle ihrerseits als Rezeptor für Kohlenhydrate bei der Zell-Zell Wechselwirkung agieren.

Besondere Bedeutung erlangten diese Moleküle durch die Entdeckung der "animal lectins" und ihrer Involvierung in viele Erkennungs- und Bindungsprozesse (siehe zum Überblick (41)).

Nach der Homologie der Aminosäuresequenzen werden die animal lectins in fünf Gruppen eingeteilt (s. Abb. 1): den C-Typ, den I-Typ, die Galektine, die Pentraxine und den P-Typ (42,43).

<u>Untergruppe</u>	<u>Ligand</u>
C-Typ	Selektine, Kollektine, PSGL-1, Ashwell-rezeptor, Rezeptor für asialo-Glykoproteine (Bindung ist Ca ²⁺ -abhängig)
I-Typ	I-CAM, N-CAM, HNK-1 Epitop, Man ₆ GlcNAc ₂ , Sialyllaktose
Galektine	β-Galaktoside, HBL
Pentraxine	sulfatierte und/oder phosphorylierte Monosaccharide
P-Typ	Mannose-6-phosphat enthaltende Glykoproteine

Abb. 1: Zusammenfassung der Lektine und ihrer Liganden

Das Studium und das genaue Wissen von Interaktionen via Kohlenhydrate ist insofern von großer Bedeutung, als Zell-Zell Wechselwirkungen bei der Tumorprogression (44) und Metastasierung eine essentielle Rolle spielen. Die Lektine sind Teil einer großen Proteinfamilie von Zell-Zell Erkennungs-/ Wechselwirkungsmolekülen, zu denen unter anderem die Immunglobulinsuperfamilie, die Integrine (45-48) und die Selektine (49-55) gehören. Diese Moleküle sind Gegenstand intensiver Forschung, weil sie mehr oder weniger stark in die Wechselwirkung verschiedener Zellen involviert sind und so einen Schlüsselpunkt im Verständnis und in der Beeinflussung der Wechselwirkung darstellen (56-61).

Bei der großen, aber anscheinend systematischen Vielfalt der Oligosaccharidstrukturen erscheint es angebracht, mehr über die Bindestellen für komplexe Kohlenhydrate in Erfahrung zu bringen. Dazu wird ein Untersuchungsmolekül benötigt, das sowohl Saccharidstrukturen als auch eine Markierung trägt.

Die Wechselwirkung via Kohlenhydrate an sich ist schwach und wird leicht von anderen Wechselwirkungen überdeckt (62-64). Daher ist es geboten, daß das Untersuchungsmolekül mehrere **gleichartige** Kohlenhydratepitope trägt.

Schon von anderen Zelladhäsionsmolekülen ist bekannt, daß die Affinität zu dem entsprechenden Bindungspartner bei einem

multivalenten Reagenz sehr viel stärker ist und so zur Erzielung des biologischen Effekts eine viel kleinere Konzentration an multivalentem Reagenz benötigt wird als bei monomerem Oligosaccharid (65-67).

In Zusammenfassung sollte man von einem solchen Untersuchungsreagenz folgende Eigenschaften fordern:

1. Es sollte strukturelle Kohlenhydratgruppenspezifität besitzen;
2. es sollte klein (niedermolekular) sein;
3. für *in vivo*-Untersuchungen sollte es wasserlöslich sein;
4. es darf keine Ladung tragen, um so eine Wechselwirkung vorzutäuschen, die nicht von den Kohlehydraten ausgeht;
5. das Untersuchungsreagenz muß multifunktionell sein, um einerseits eine Mehrfachbeladung mit Kohlenhydratstrukturen zu ermöglichen, andererseits noch die Bindung einer Markierung zu ermöglichen.

Zur Erfüllung aller dieser Voraussetzungen fanden wir das Dipeptid γ -L-Glutamyl-glutaminsäure als Trägermolekül für die Oligosaccharidstrukturen und der Markierungsgruppe geeignet.

Als Quelle für Oligosaccharide wurden zum einen kommerziell erhältliches Glukosamin zum anderen Glykosphingolipidderivate gewählt. Letztere zeichnen sich dadurch aus, daß die Kohlenhydratstrukturen leicht zugänglich und vor allem strukturell einheitlich sind.

2. MATERIAL UND METHODEN

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht abweichend aufgeführt, von den Firmen MERCK (Darmstadt), RIEDEL-DE HAEN (Seelze), SERVA (Heidelberg), ALDRICH (Steinheim), BOEHRINGER (Mannheim), FLUKA (Buchs, Schweiz) und SIGMA (St. Lois MO, USA) mit p.A. Reinheit käuflich erworben.

Fertig gepackte Chromatographiesäulen und Säulenmaterialien wurden von WATERS (Milford MA, USA), PHARMACIA (Uppsala, Schweden) und BIO-RAD (Richmond CA, USA) bezogen.

Die Gase Stickstoff und Sauerstoff (zur Ozondarstellung) wurden von der Firma MESSER GRIEßHEIM (Frankfurt/Main) bezogen.

Das verwendete ABC-Reagenz (Avidin-Biotin Complex) auf Biotin wurde von der Firma Vector Lab. (Vertrieb Boehringer Ingelheim, D) gekauft.

HPTLC-analyse der GSL

Laufmittel

Nr.	Zusammensetzung	Verhältnis(v/v/v)
I	CHCl ₃ :CH ₃ OH:H ₂ O	45:45:10
II	CHCl ₃ :CH ₃ OH:H ₂ O	60:25:4
III	PrOH(1):H ₂ O	7:3
IV	MeOH:H ₂ O	7:3
V	BuOH(1):HOAc:H ₂ O	4:1:1
V	BuOH(1):HOAc:H ₂ O	60:30:10
VI	MeOH:H ₂ O	7:3

Die Dünnschichtchromatographie wurde auf Glasplatten, die mit Kieselgel 60 beschichtet sind, der Fa. Merck durchgeführt.

Bei der HPTLC-analyse von GSL muß berücksichtigt werden, daß die GSL aufgrund der variierenden Zusammensetzung des Ceramids kein einheitliches Bild ergeben, obwohl die Zusammensetzung der Oligosaccharidkette gleich ist. So sind allein 60 verschiedene Formen des Sphingosins bekannt (68). Nimmt man jedoch noch die Acylierung des Sphingosins mit verschiedenen Fettsäuren dazu, gelangt man schnell zu einer großen Zahl an möglichen Formen.

(Die fett gedruckten Zahlen in Klammern bezeichnen die Verbindungen in den Schemata in der Diskussion.)

2.1 Synthese von (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (2)

27,6 mg (0,1 mmol) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (Glu₂) wurden in 2 ml 0,1 M Natriumhydrogencarbonatlösung gelöst und mit einer Lösung aus 34,6 mg (0,1 mmol) Biotin-N-succinimidester in 1 ml DMF versetzt.

Nach 4 Stunden wurde durch Zugabe von 20 μ l Triethylamin ein pH-Wert von 8 eingestellt und weitere 20 mg Biotin-N-succinimidester zugefügt.

So resultiert ein Verhältnis:

Glu₂ : Biotin-N-succinimidester = 1:1,6

Dieser Ansatz wurde bei Raumtemperatur für 24 Stunden gerührt und anschließend lyophilisiert.

Zum Entsalzen wurde der Ansatz in 4 ml Wasser aufgenommen und über eine frisch regenerierte Dowex 50-H⁺ (V=2 ml) gegeben.

Mit 40 ml Wasser wurde eluiert. Das Eluat wurde einrotiert, in 10 ml Wasser aufgenommen und dünnschichtchromatographisch analysiert.

2.2 Hydrolyse von (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (2)

7,94 μ g (0,01 mmol) (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (2) wurden zur Trockne gebracht und mit 1 ml 1 M Salzsäure für 4 Stunden bei 100°C inkubiert.

Anschließend wurde mit Wasser verdünnt und die Salzsäure wiederholt abgedampft.

Zuletzt wurde der Ansatz in 500 μ l Wasser aufgenommen und dünnschichtchromatographisch untersucht.

2.3 Synthese von (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-trisuccinimidester (Biotin-Glu₂-succ₃) (3)

Die (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (2) wurde mit 12,08 mg (0,11 mmol) N-Hydroxysuccinimid und 21,67 mg (0,11 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 5 ml DMF aufgenommen. Es wurde mit Stickstoff überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt.

2.4 Isolierung von Galaktosylcerebrosid (GalCer)

100 g menschliches Hirn wurde in Aceton homogenisiert und in Aceton für 24 Stunden bei 4°C stehengelassen. Der klare Überstand wurde dekantiert und der Rückstand abfiltriert. Mit $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 10:10:1$ wurde zweimal für je 2,5 Stunden extrahiert, die Extrakte vereinigt und zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in Methanol aufgenommen und mit Natriumhydroxidlösung bei einem pH-Wert von 12 für 4 Stunden bei 50°C verseift. Dann wurde mit Essigsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt und gegen Wasser dialysiert. Nach einer Woche wurde das Dialysat, das ein Gemisch aus Sgal1/GalCer/Ganglioside darstellte, in 200 ml Chloroform:Methanol = 1:1 gelöst.

Diese Lösung wurde auf eine DEAE-Sephadex A 25 Säule Acetat-form ($V=200$ ml) gegeben.

Um die neutralen GSL abzutrennen, wurde die Säule mit 500 ml Methanol gewaschen.

Danach wurde sukzessive mit je 400 ml 0,02 M, 0,04 M und 0,1 M und 1000 ml 1 M methanolischer Ammoniumacetatlösung eluiert; dabei wurden die letzten Milliliter der Elution mit 1 M Ammoniumacetatlösung getrennt aufgefangen.

Anschließend wurden alle Fraktionen gegen Wasser dialysiert, zur Trockne gebracht, in Methanol aufgenommen und dünnschicht-chromatographisch analysiert.

2.5 Chemische Modifizierung von Galaktosylcerebrosid (6) zu reduktaminiertem Galaktosylcerebrosid

2.5.1 Ozonolyse

6 mg (8,25 μ mol) GalCer (6) wurden in 5 ml Methanol gelöst. Bei Raumtemperatur wurde durch diese Lösung Ozon mit einer Geschwindigkeit von 1-2 Blasen/s geleitet, bis eine nachgeschaltete Kaliumjodid-Stärke-Lösung durch unverbrauchtes Ozon violett gefärbt wurde (ca. 15 Minuten).

Anschließend wurde durch die Reaktionsmischung für 5 Minuten Stickstoff geleitet, um restliches Ozon auszutreiben.

2.5.2 Reduktive Aufarbeitung des Ozonids

Durch Zugabe von 30 μ l Dimethylsulfid und eine Inkubation für 12 Stunden bei 4°C wurde das Primärozonid zum Aldehyd reduziert. Nach kaltem Einrotieren am Rotationsverdampfer wurde der abgespaltene Aldehyd durch wiederholte Extraktion mit n-Hexan (3 x 2 ml, dreiminütige Ultraschallbehandlung, 15 Minuten Zentrifugation bei 3800 x g) entfernt.

2.5.3 Reduktaminierung

Der Extraktionsrückstand wurde zusammen mit 15,0 mg Natriumcyanoborhydrid in 5 ml 1 M methanolischer Ammonium-acetat-Lösung aufgenommen und für 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

Zum Entsalzen wurde das Reaktionsgemisch zur Trockne eingedampft und auf eine mit 20 ml Methanol, 10 ml Methanol:Wasser=1:1 und 20 ml Wasser vorgewaschene Sep-Pak C18-Säule der Firma Waters gegeben. Mit 20 ml Wasser wurde das Salz von der Säule gewaschen, bevor mit 20 ml Methanol eluiert wurde.

2.5.4 Isolierung des Aminoprodukts (7)

Der Ansatz wurde in 150 µl Methanol auf eine regenerierte Dowex 50 H⁺ Säule (V=5ml) in Methanol rekursiv aufgetragen. Nicht umgesetztes GalCer wurde mit 50 ml Methanol von der Säule gewaschen, bevor mit 50 ml 0,1 M methanolische HCl eluiert wurde.

2.6 Kupplung von Biotin-Glu₂-succ₃ (3) mit Glukosamin

2,5 µmol Biotin-Glu₂-trisuccinimidester (3) wurden einrotiert und in 500 µl DMF aufgenommen.

Diese Lösung wurde zu einer Lösung von 16,17 mg (0,075 mmol) Glukosamin-Hydrochlorid (10 facher Überschuß) in 500 µl DMF, die mit 10 µl Triethylamin auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt worden war, gegeben.

Bei Raumtemperatur wurde für 48 Stunden gerührt.

2.6.1 Isolierung des Glykokonjugats (8)

Dazu wurde der Konjugatansatz in 150 µl Acetonitril:Wasser=1:1 aufgenommen und auf eine Säule aus Sephadex LH 20 (V=20 ml), die mit 200 ml Acetonitril:Wasser=1:1 equilibriert worden war, aufgetragen. Mit 200 ml Acetonitril:Wasser=1:1 wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min chromatographiert, wobei Fraktionen von 5 ml geschnitten wurden.

Um den Überschuß an Glukosamin abzutrennen, wurden die Fraktionen mit dem Glykokonjugat über eine Kieselgelsäule (V=10 ml) gegeben. Mit BuOH:HOAc:H₂O=60:30:10 wurde das Glukosamin abgetrennt, bevor das Glykokonjugat mit 100 ml Wasser eluiert worden ist. Der vom überschüssigen Glukosamin befreite Ansatz wurde zur Trennung der mono-, di-, bzw. triglykosilierten Konjugate in 200 µl Wasser auf eine DEAE-Sephadex A 25 Acetat Säule (V=25 ml) gegeben.

Zuerst wurde das ungeladene triglykosilierte Glykokonjugat mit 50 ml Wasser von der Säule gewaschen, danach wurde sukzessive mit je

100 ml 1 M und 2 M Ammoniumacetatlösung eluiert und dünnschichtchromatographisch analysiert.

Schließlich wurden die Spots mit dem kleinsten R_f -Wert, die mit Orcin-Reagenz reagierten (Waschen mit Wasser und Elution mit 1 M Ammoniumacetatlösung) aus dem Dünnschichtchromatogramm ausgekratzt, und das Kieselgel wurde mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde mit ABC-Reagenz auf Biotin getestet.

2.7 Kupplung von Biotin-Glu₂-succ₃ (3) mit isoliertem reduktaminiertem Galaktosylcerebrosid (7)

Zu 1,85 µg (2,5 mmol) Biotin-Glu₂-trisuccinimidester (3) wurden 30,8 mg (5,6 mmol) isoliertes reduktaminiertes GalCer (7) in 500 µl DMF gegeben, mit 50 µl Diisopropylethylamin versetzt, mit Stickstoff überschichtet und bei Raumtemperatur stengelassen. Nach 3 Tagen wurde die Reaktionsmischung zur Trockne gebracht. Der Reaktionsansatz wurde in 5 ml Wasser aufgenommen und dünnschichtchromatographisch untersucht.

2.7.1 Isolierung des Glykokonjugats (10)

Dazu wurde der Konjugatansatz in 150 µl Acetonitril:Wasser=1:1 aufgenommen und auf eine Säule aus Sephadex LH 20 (V=20 ml), die mit 200 ml Acetonitril:Wasser=1:1 equilibriert worden war, aufgetragen. Mit 200 ml Acetonitril:Wasser=1:1 wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,4 ml/min chromatographiert, wobei Fraktionen von 5 ml geschnitten wurden.

Die Fraktionen wurden einrotiert, in 50 µl Wasser gelöst und dünnschichtchromatographisch analysiert.

Zur Trennung der mono-, di-, bzw. triglykosylierten Konjugate wurde die Fraktion mit dem Glykokonjugat in 200 µl Wasser auf eine DEAE-Sephadex A 25 Acetat Säule (V=25 ml) gegeben.

Zuerst wurde das ungeladene triglykosylierte Glykokonjugat mit 50 ml Wasser von der Säule gewaschen, danach wurde sukzessive mit je 100 ml 1 M und 2 M Ammoniumacetatlösung eluiert.

Die Fraktionen wurden zur Trockne gebracht, in Wasser aufgenommen und dünnschichtchromatographisch analysiert.

Schließlich wurden die Spots mit dem kleinsten R_f -Wert, die mit Orcin-Reagenz reagierten (Waschen mit Wasser und Elution mit 1 M Ammoniumacetatlösung) aus dem Dünnschichtchromatogramm ausgekratzt, und das Kieselgel wurde mit Wasser eluiert. Das Eluat wurde mit ABC-Reagenz auf Biotin getestet.

2.8 Nachweise für die Dünnschichtchromatographie

2.8.1 Nachweis hydrophober Substanzen (69)

Das HPTLC wird nach der Entwicklung und nach dem Abdampfen des Laufmittels in einen Trog mit Jodkörnchen gestellt. Hydrophobe Substanzen geben sich durch Gelb- bis Violettfärbung zu erkennen. Nach dem Abdampfen des Jod sind die Dünnschichtchromatogramme noch für jede andere Nachweisreaktion verwendbar.

2.8.2 Nachweis von primären Aminogruppen (69)

0,3 g Ninhydrin werden in 100 ml 1-Butanol gelöst und mit 3 ml Essigsäure versetzt. Mit dieser Lösung wird das HPTLC kurz angesprüht und bei 120°C entwickelt. Nach 5-10 Minuten sind die Substanzen mit primärer Aminogruppe rot bis rot-blau zu erkennen.

2.8.3 Nachweis sekundärer Aminogruppen (69)

Das HPTLC wird nach Beendigung der Entwicklung zuerst einer Inkubation mit Chlor unterzogen, das überschüssige Chlor abgeblasen, gefolgt von einem Ansprühen mit einer Lösung aus o-Tolidin.

Stickstoffhaltige Verbindungen erscheinen als blaue Flecken (70,71).

Da diese Reaktion sowohl mit primären als auch mit sekundären Aminoverbindungen abläuft, ist die Aussage, um was für eine Aminogruppe es sich handelt, in Kombination mit der Ninhydrinreaktion möglich.

Das Chlor wird wie folgt *in situ* gewonnen: gleiche Volumina einer 1,5 %igen KMnO_4 -lsg. und einer 10 %igen HCl -lsg. werden zusammengegeben.

Dabei wird das Chlorid vom Permanganat zum Chlor oxidiert.

Wirkt das Chlor auf eine stickstoffhaltige Verbindung auf dem Dünnschichtchromatogramm ein, so wird (werden) nun das (die) Wasserstoffatom(e) am Stickstoff substituiert.

Danach besprüht man das Dünnschichtchromatogramm mit einer Lösung aus 32 mg o-Tolidin, 0,2 g KJ und 6 ml Eisessig auf 100 ml Wasser. Dabei reagiert das Chloramin mit dem o-Tolidin unter Bildung eines chinoiden Systems zu einem blauen Farbstoff.

2.8.4 Nachweis von Zuckern

Das HPTLC wird mit einer Lösung aus 0,2 g Orcin in 89,3 ml destilliertem Wasser und 10,7 ml konzentrierter H_2SO_4 gleichmäßig angesprüht. Anschließend wird für 3-5 Minuten bei 120°C entwickelt. GSL erscheinen violett-braun.

2.8.5 Nachweis von Succinimidestern (69,72,73)

Sprühlösungen:

1.: 14% NH_2OH , 14% NaOH in H_2O

2.: 5% FeCl_3 in 1.2 N HCl

Prozedur: Das HPTLC wird zunächst mit Lösung 1 angesprüht und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dabei reagiert das Hydroxylamin mit dem Succinimidrest zur Monohydroxamsäure.

Nach der Inkubation wird das HPTLC mit Lösung 2 angesprüht. Nun bildet sich ein rot-gelber Farbkomplex aus der Hydroxamsäure und dem Eisenatom.

Eine deutliche Verstärkung der Färbung ist zu erreichen, indem das HPTLC nach dem Besprühen mit der 2. Lösung für ca. 12 Stunden im Dunkeln bei 4°C gelagert wird.

2.8.6 Nachweis von Biotin

Folgende Sprühlösung wird zusammengestellt:

5 ml 6 %ige KI, 4,85 ml Wasser und 150 µl 10 %ige $\text{H}_2(\text{PtCl}_6) \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$; damit wird das DC dünn angesprüht. Biotinhaltige Substanzen erscheinen als weiße Flecken auf einem rosa Hintergrund. Die Sprühlösung ist im Kühlschrank mehrere Tage haltbar. Allerdings ist dieser Nachweis nicht gut brauchbar, da der Kontrast zwischen Hintergrund und Substanzflecken nicht gut zu sehen ist. Daher ist hier noch ein weiteres Verfahren angeführt:

Biotin/Biotinhaltige Verbindungen (Biotin-Glu₂, Biotin-Glu₂-trisuccinimidester, biotinyliertes Glykokonjugat) werden auf eine PVDF-membran Immobilon-P der Fa. Millipore spotförmig aufgetragen. Zur besseren Bindung wird die Membran für 10 Stunden bei 4°C inkubiert.

Danach wird sie für 1 Stunde mit 30 Minuten vor Gebrauch angesetzten ABC-Reagenz nach Anleitung der Fa. Vector inkubiert. Nun wird 3 mal für je 3 Minuten mit 0,1 M phosphatgepufferter Salzlösung pH=7,4 gewaschen.

Anschließend erfolgt die Färbung mit 4-Chloro-1-naphtol/ H_2O_2 : 1 ml einer Lösung aus 15 mg 4-Chloro-1-naphtol in Methanol werden in 25 ml 10 mM PBS/0,05% Tween 20 gegeben; die trübe Lösung wird filtriert, unmittelbar vor Gebrauch mit 10 µl 30% H_2O_2 versetzt und auf die Immobilonmembran gegeben.

3. Ergebnisse

Zuerst wurde das Trägermolekül γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure mit einer Markierungsgruppe versehen und die primäre Aminogruppe verschlossen, so daß es nicht zu einer homogenen Kondensation kommen konnte.

3.1 Synthese von (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (2)

Die eingesetzte γ -Glu₂ ist zu (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (2) umgesetzt worden.

Der Reaktionsansatz reagiert nicht mehr mit Ninhydrin s. Abb. 2a, Spur 2.

Durch die Reaktion ist das Molekulargewicht zwar angestiegen, aber in saurem Laufmittel liegt das Molekül ungeladen vor. Dadurch nimmt der R_f -Wert deutlich zu, s. Abb. 2b, Spur 6, Pfeil.

Bei saurer Hydrolyse der isolierten Substanz entstand erwartungsgemäß Glutaminsäure, s. Abb. 2 a/b, Spur 3,7.

Abb. 2: HPTLC-Analyse der Synthese von (2'-N-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-

L-glutaminsäure (**2**);

Spur 1,5: Referenz γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure,

Spur 2,6: 2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure (**2**), Pfeil,

Spur 3,7: hydrolysierte (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure,

Spur 4,8: Referenz Glutaminsäure;

*: unspezifische Färbung, Biotinester

Laufmittel V,

A)

Färbung mit: Ninhydrin ;B) Färbung mit: Cl₂-Tolidin

3.2 Synthese von (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäuretrisuccinimidester (3)

Die Umsetzung von (2) mit N-Hydroxysuccinimid ergab den Ester, wobei durch den Überschuß an NHS erreicht worden ist, daß alle Carboxylgruppen zu dem entsprechenden Succinimidester verestert worden sind, so wie es in Abbildung 3, Spur 2,8 (Pfeil) zu sehen ist.

Durch den Überschuß an N-Biotinester bei der Synthese von (2) enthält die eingesetzte Biotin-Glu₂ noch Biotin.

Das Reaktionsprodukt ist so labil, daß Versuche, ihn zu isolieren, mit der Abspaltung von Succinimid und der Generation von Carboxylgruppen resultierten. Insofern ist auf eine Aufreinigung verzichtet worden.

Abb. 3: HPTLC-Analyse der Synthese von (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-

L-glutaminsäuretrisuccinimidester (3)

Spur 1,7: Referenz N-Hydroxysuccinimid,

Spur 2,8: (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-

L-glutaminsäuretrisuccinimidester, Pfeil,

Spur 3,9: (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-

L-glutaminsäure,

Spur 4,10: Referenz DCC,

Spur 5,11: Referenz DHU,

Spur 6,12: Referenz Biotin;

Laufmittel: II,

A) Hydroxylamin-Eisen(III)chlorid; B) Cl₂-Tolidin

3.3 Isolierung von Galaktosylcerebrosid aus Rinderhirn (6)

Das Dialysat der Verseifung, das ein Gemisch der GSL GalCer, Sgal1 und Gtet1 darstellte (Abb. 4, Spur 1), wurde durch die Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt: mit Methanol wurde das GalCer von der Säule gewaschen, da es nicht an DEAE-Sephadex-A 25 Acetat Säule band (Abb. 4, Spur 2), während mit Ammoniumacetat die geladenen Glykosphingolipide von der Säule eluiert worden sind (Abb. 4, Spur 3). Ein Vergleich mit entsprechenden Standardsubstanzen (Abb. 4, Spur 4, Spur 5 bzw. Spur 6) weist diese Substanzen als Sgal1, Gtet1 bzw. GalCer aus.

Abb. 4: HPTLC-Analyse der Isolierung von Galaktosylcerebrosid
(6)

Spur 1:	Dialysat (GSL-gemisch),
Spur 2:	Waschen der DEAE-Sephadexsäule mit Methanol,
Spur 3:	Elution mit 1 M methanol.

Ammoniumacetatlösung,

Spur 4:	Referenz Sgal1,
Spur 5:	Referenz Gtet1,
Spur 6:	Referenz GalCer;

Laufmittel: II,

Detektionsreagenz: Orcin

3.4 Chemische Modifizierung von Galaktosylcerebrosid (6)

Die verschiedenen Stadien der Ozonolyse mit anschließender Reduktaminierung sind deutlich in der Abbildung 5 zu erkennen. Bei der Behandlung mit Ozon reagierte nur die obere Bande I, die danach das Sphingosin-haltige (ungesättigte) GalCer repräsentieren muß.

Die Ausführung der Ozonolyse in Methanol bewirkte die Entstehung der Methoxyhydroperoxide (74), die durch das Dimethylsulfid zu den Aldehyden reduziert wurden (75).

Abb. 5: HPTLC-Verlaufskontrolle der Synthese von
reduktaminiertem Galaktosylcerebrosid (7) durch
ozonolytische Spaltung und Reduktaminierung von
Galaktosylcerebrosid (6)

Spur 1: Referenz Galaktosylcerebrosid,
Spur 2: Ozonolyseprodukt (II),
nicht umgesetztes GalCer (I),
Spur 3: Reduktion des Ansatz',
Spur 4: Reduktaminierung des Ansatz';

Laufmittel: II,
Detektionsreagenz: Orcin über Ninhydrin (Kreise)

3.5 Synthese von Glykokonjugaten

Das Trägermolekül **(3)**, das zur Kupplung vorbereitet worden war, wurde nun mit den Kohlenhydratliganden umgesetzt.

3.5.1 Synthese des Glykokonjugat **(8)**

Dazu wurde der (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-trisuccinimidester **(3)** mit kommerziell erhältlichem Glukosamin umgesetzt und es resultierte das Glykokonjugat **(8)**.

Abb. 6: HPTLC-Analyse der Synthese des Konjugats **(8)** und die Aufreinigung über DEAE-Sephadex A 25 Acetat
Spur 1: Referenz Glukosamin,
Spur 2: roher Kupplungsansatz,
Spur 3: Waschen mit Wasser, Pfeil markiert das Glykokonjugat,
Spur 4: Elution mit 1 M Ammoniumacetat,
Spur 5: Elution mit 2 M Ammoniumacetat;

Laufmittel: VI,
Färbung mit Orcin über Ninhydrin (Kreise) -

Abb. 7: Immobilon-P PVDF-Membran, mit ABC-Reagenz inkubiert,
mit
4-Chloro-1-naphtol angefärbt
Aufreinigung über DEAE-Sephadex A 25 Acetat;
Spur 1: Referenz Biotin,
aus Spur 2: ausgekratztter Spot , eluiertes Kieselgel
Abbildung 6, Spur 3,
Spur 3: ausgekratztter Spot, eluiertes Kieselgel aus
Abbildung 6, Spur 4,
Spur 4: ausgekratztter Spot, eluiertes Kieselgel aus
Abbildung 6, Spur 5

Jedoch zeigte auch die mit 1 M Ammoniumacetat-Lösung eluierte Substanz eine schwache Reaktion mit Orcin (Abb. 7, Spur 4) und auch der Nachweis von Biotin in der Elution mit 1 M Ammoniumacetat (Abb. 8, Spur 3) fiel positiv aus. Daraus muß geschlossen werden, daß auch ziemliche Mengen diglykosyliertes Glykokonjugat entstanden sind.

3.5.2 Synthese des Glykokonjugats (10)

Dazu wurde der (2'-N'-Biotinyl-) γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäuretrisuccinimidester (3) mit reduktaminiertem GalCer (7) umgesetzt und es entstand das Glykokonjugat (10).

Die Aufreinigung des Ansatz, der noch überschüssiges reduktaminiertes Galaktosylcerebrosid enthält, über DEAE-Sephadex A 25 Acetat ergab ein Molekül, das nicht an die Säule band (Abb. 9, Spur 3). Aus der Tatsache, daß das neu entstandene Molekül nicht an das Säulenmaterial band, läßt sich schließen, daß alle Carboxylgruppen verschlossen sind. Die Reaktion mit Orcin zeigt, daß das neue Molekül zuckerhaltig ist, und daneben ein hohes Molekulargewicht hat, da es bei der Dünnschichtchromatographie nicht mehr läuft. Daneben konnte auch gezeigt werden, daß das Molekül Biotin enthält (s. Abb. 10, Spur 3), so daß damit das Glykokonjugat mit drei reduktaminierten Galaktosylcerebrosidepitopen synthetisiert ist. Aus der schwachen Reaktion mit Orcin (Abb. 9, Spur 4) und der positive Nachweis von Biotin in der Elution mit 1 M Ammoniumacetat (Abb. 10, Spur 3) muß allerdings geschlossen werden, daß auch geringe Mengen diglykosyliertes Glykokonjugat entstanden sind.

Abb. 8: HPTLC-Analyse der Synthese des Konjugats (**10**) und die Aufreinigung über Sephadex LH 20
Spur 1: reduktaminiertes, isoliertes GalCer (**7**),
Spur 2: Glykokonjugat (**10**),
Spur 3: Fraktion #1,
Spur 4: Fraktion #2,
Spur 5: Fraktion #3, Pfeil markiert das Glykokonjugat,

Spur 6: Fraktion #4,
Spur 7: Fraktion #5,
Spur 8: Fraktion #6,
Spur 9: Fraktion #7;

Laufmittel: VI,
Detektionsreagenz: Orcin über Ninhydrin (Kreise)

Die Glykokonjugate mit nur zwei bzw. einem Kohlenhydratliganden banden an das DEAE Sephadex A 25 Acetat Säulenmaterial und sind erst durch die Elution mit Ammoniumacetat isoliert worden.

Abb. 9: HPTLC-Analyse der Synthese des Konjugats (**10**) und die
Aufreinigung über DEAE-Sephadex A 25 Acetat
Spur 1: reduktaminiertes, isoliertes GalCer (**7**),
Spur 2: über LH 20 gereinigter Kupplungsansatz,
Spur 3: Waschen mit Wasser,
Spur 4: Elution mit 1 M Ammoniumacetat,
Spur 5: Elution mit 2 M Ammoniumacetat;

Laufmittel: VI,
Färbung mit Orcin über Ninhydrin (Kreise)

Abb. 10: Immobilon-P PVDF-Membran, mit ABC-Reagenz inkubiert,
mit
4-Chloro-1-naphtol angefärbt
Aufreinigung über DEAE-Sephadex A 25 Acetat;
Spur 1: Referenz Biotin,
aus Spur 2: ausgekratztter Spot , eluiertes Kieselgel
Abbildung 9, Spur 3, Waschen mit Wasser,
Spur 3: ausgekratztter Spot, eluiertes Kieselgel aus
Abbildung 9, Spur 4, Elution mit 1 M
Ammoniumacetat,
Spur 4: ausgekratztter Spot, eluiertes Kieselgel aus
Abbildung 9, Spur 5, Elution mit 2 M
Ammoniumacetat

4. DISKUSSION

Tumorprogression und Metastasierung sind eng verknüpft mit den Oberflächeneigenschaften der Krebszelle (44), und es gibt gute Gründe anzunehmen, daß dabei unter anderem Kohlenhydrate als Glykokonjugate an der Zelloberfläche beteiligt sind (76). Zahlreiche Befunde deuten auf die Involvierung von Kohlenhydraten an der Interaktion von Zellen hin.

- a) Bestimmte Kohlenhydrate/Kohlenhydratkonjugate verhindern die Adhäsion von Zellen (77,78). Die Konjugate binden an eine Säule, die zuvor mit dem komplementären Glykosphingolipid beschichtet worden ist (79,80); die Kohlenhydrate inhibieren die Adhäsion von Liposomen mit Glykosphingolipiden an Plastikoberflächen, die mit Glykosphingolipiden beschichtet sind (79,81,82). Desweiteren ist beobachtet worden, daß Le^x-liposomen die Dialyse von Laktoneopentaose hemmen (80).
- b) Liposomen mit inkorporierten Glykosphingolipiden aggregieren an Glykosphingolipidliposomen (79-81,83,84), an Säulen, die mit Glykosphingolipiden beschichtet sind (80) und an mit Glykosphingolipiden beschichteten Plastikoberflächen (46,79,82). Liposomen mit eingebautem Galaktosylcerebrosid binden an mit Sulfatid beschichteten Oberflächen. Da sowohl GalCer als auch Sulfatid in größeren Mengen im Myelin vorkommen, wird eine Stabilisierung der Myelinschicht durch die Bindung von Sulfatid an Galaktosylcerebrosid postuliert (80,84,85).
- c) Aus NMR-Untersuchungen sind Modelle von Gangliotriaosylceramid und Sialosyllactosylceramid errechnet worden, die komplementäre Strukturen darstellen und so deren Interaktion auf molekularer Ebene verdeutlichen (80,82,86).

Daneben ist auch bei vielen Adhäsionsvorgängen in der Natur die Beteiligung der Kohlenhydrate gezeigt worden (s. Abb. 11):

- d) Viele Toxine (z. B. Tetanus toxin, Botulinus toxin, Shiga toxin, Ricin, Cholera toxin, Verotoxin (37,87-93)) binden an Glykosphingolipide der Zelloberfläche. Das ermöglicht ihnen, in die Zelle einzudringen und dann eine toxische Wirkung zu entfalten.
- e) Auch von verschiedenen körpereigenen Stoffen nimmt man an, daß sie Glykosphingolipide zur Bindung benutzen, um erst dann zu wirken: Choriongonotropin, Lutropin, Thyrotropin (94-97).
- f) Die Eigenschaft mancher Bakterien, humanpathogen zu wirken, ist darauf zurückzuführen, daß sie auf ihrer Oberfläche Lipooligosaccharide exprimieren, die Glykosphingolipiden der Globo- oder der Neolactoserie ähneln (30,87). So gelingt es diesen Bakterien, das Immunsystem zu überwinden, ohne als fremd erkannt zu werden, so z.B. Escherichia coli, Propionibakterium, Streptococcus pneumonia, Neisseria gonorrhoea (87,98-100) und Helicobacter pylori (101,102).
- g) So wie Bakterien, gebrauchen auch Viren die Glykosphingolipide, um an Zellen zu binden und die Zellen zu befallen.
Beispiele sind das Influenza Virus, das an Sialinsäure bindet (103-105) und das HIV, dessen Oberflächenprotein gp 120 das Glykosphingolipid Galaktosylcerebrosid auf einer Zelle als Rezeptor benutzt, um dann an die Zelle zu binden (106-111). Weiterhin ist beobachtet worden, daß der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen Galaktosylcerebrosid die Bindung des Virus' an die Zelle verhindert (112).

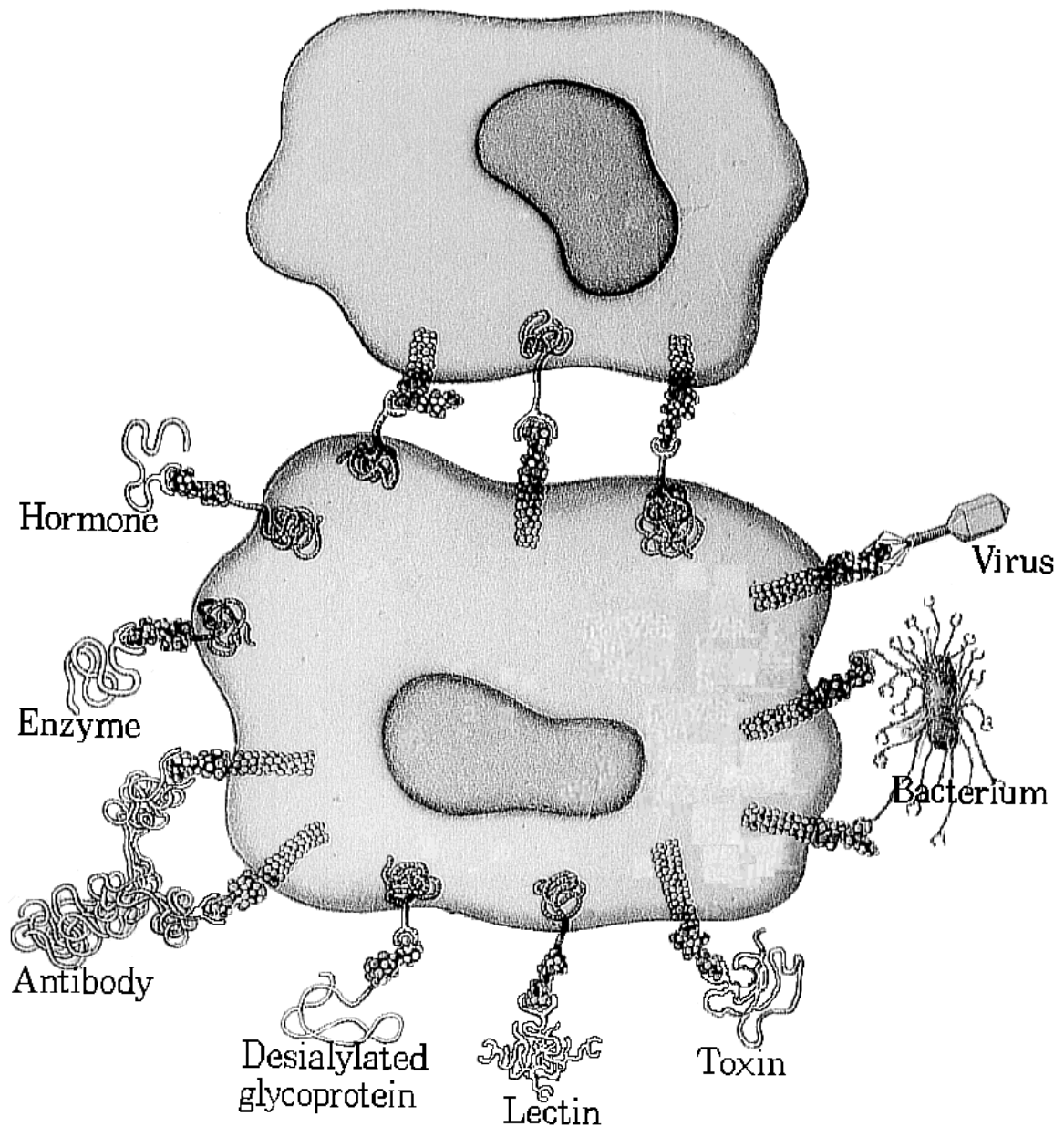


Abb. 11: Zusammenfassung der Wechselwirkungen einer Zelle mit extrazellulären Strukturen via Kohlenhydrate

Die Kohlenhydrate liegen als Glykoproteine oder als Glykolipide vor. Letztere werden hier wegen des Zusammenhangs mit dem Thema der vorliegenden Arbeit besonders betrachtet. Die meisten Glykolipide kommen als Glykosphingolipide in der Plasmamembran vor (13,113-117). Darüber hinaus sind Glykosphingolipide in intrazellulären Organellen (118-123) und am Zellkern (124) gefunden worden.

Für die Konstruktion eines Glykokonjugats auf der Basis eines Glykosphingolipids für die Erforschung von Kohlenhydratbindestellen ist es erforderlich, den Aufbau eines Glykosphingolipids zu kennen.

Die Glykosphingolipide sind einerseits aus einem hydrophoben Teil (Ceramid) und andererseits aus einem hydrophilen Teil (Oligosaccharidkette) aufgebaut (12).

Als Ceramid wird die Stickstoffbase Sphingosin (2*S*,3*R*-2-Amino-*trans*-4-octadecen-1,3-diol) mit einer amidartig gebundenen Fettsäure bezeichnet (125). Die zwei Stereozentren an C2 und C3 im Sphingosinmolekül ergeben 4 Konformationsmöglichkeiten; in Glykosphingolipiden kommt aber fast ausschließlich die erythro-2*S*,3*R*-Form vor (126).

Hydrophober und hydrophiler Molekülteil sind durch eine glykosidische Bindung an der primären Hydroxylgruppe des Sphingosin miteinander verbunden s. Abb. 12.

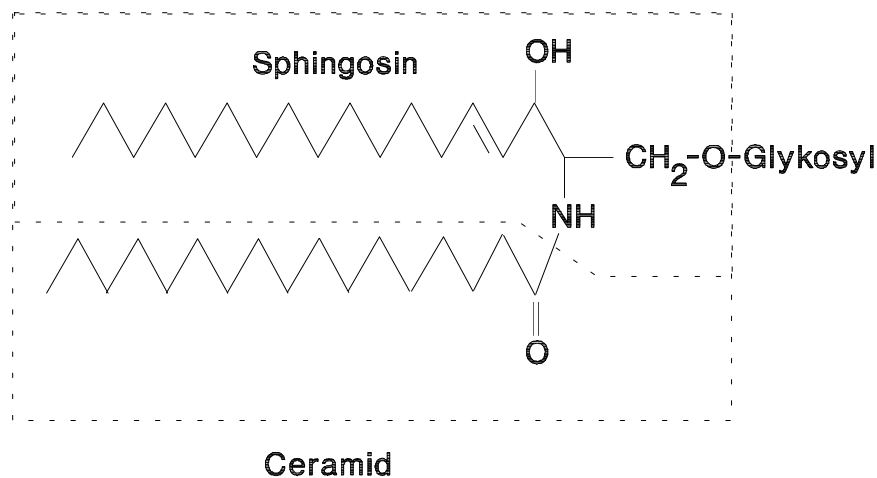


Abb. 12: Struktur eines Glykosphingolipids
 Ceramid = Amid aus Fettsäure und Sphingosinbase
 Der an die primäre Hydroxylgruppe des Sphingosin
 glykosidisch gebundene Kohlenhydratteil ragt in den
 extrazellulären Raum

Ceramid hat mit der sekundären Hydroxylgruppe einen Wasserstoffdonor und mit dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe einen Wasserstoffakzeptor. Daher sind die Glykosphingolipide im Gegensatz zu den anderen Membranmolekülen (Phospholipiden, Glyceriden) in der Lage, intra- und intermolekulare Wasser-

stoffbrückenbindungen zu bilden und so die Rigidität der Membran wesentlich zu erhöhen (86,127).

Abhängig davon, aus welchem Gewebe die Glykosphingolipide isoliert worden sind und abhängig von der Sequenz der ersten Monosaccharide der Oligosaccharidkette, kann man die Glykosphingolipide in Serien einteilen (12,13).

Struktur	Serie	Abkürzung
Gal β 1->3GalNAc β 1->4Gal β 1->4Glc->Cer	Ganglio-	GgOse ₄ Cer
Gal α 1->4Gal β 1->4Glc->Cer	Globo-	GbOse ₃ Cer
Gal α 1->3Gal β 1->4Glc->Cer	isoGlobo-	iGbOse ₃ Cer
Gal β 1->3GlcNAc β 1->3Gal β 1->4Glc->Cer	Lacto-	iLcOse ₄ Cer
Gal β 1->4GlcNAc β 1->3Gal β 1->4Glc->Cer	neoLacto-	nLcOse ₄ Cer
Gal β 1->3Gal β 1->4Glc->Cer	Muco-	McOse ₃ Cer

Abb. 13: Einteilung der Glykosphingolipide der Vertebraten in Serien anhand der Struktur der Oligosaccharidkette

Die Variabilität der Glykosphingolipide beschränkt sich nicht nur auf das Vorhandensein unterschiedlicher Sequenzen und Verknüpfungen der Monosaccharide. Durch Anfügen von Seitenkettenbausteinen steigt die Anzahl der möglichen Strukturen der Glykosphingolipide stark an.

Es gibt Glykosphingolipide, die *Ganglioside*, bei denen an der Saccharidkette Neuraminsäure (5-Amino-3,5-didesoxy-D-glycero- β -D-galactononulosaminsäure) angefügt ist.

Weitere GSL-varianten sind die Sulfat-haltige Glykosphingolipide, die *Sulfatide* und die *Fukolipide*, Glykosphingolipide mit meist seitenkettenständiger Fukose (z.B. die Blutgruppensubstanzen).

Bei der Feinlokalisierung der Glykosphingolipide in der Plasmamembran ist gefunden worden, daß die GSL in der Zellmembran selten einzeln angeordnet sind, sondern sich zu Flecken zusammenlagern (s. Abb. 14), so wie Kojima et al. es postuliert hat (45).

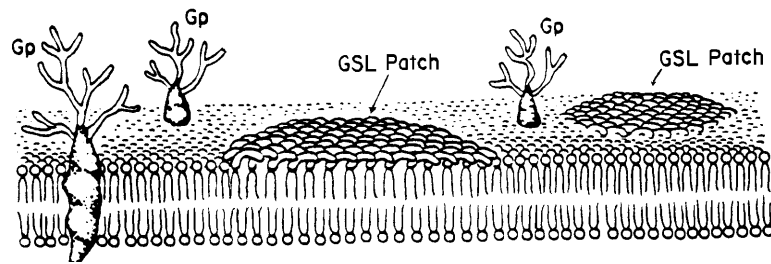


Abb. 14: Aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen abgeleitete, hypothetische Anordnung von Glykoproteinen und Glykosphingolipiden in der Zellmembran (aus (45), mit freundlicher Genehmigung der Oxford University Press)

Besondere Beachtung haben die Glykosphingolipide durch die Korrelation zwischen Struktur der Oligosaccharide und der Karzinomart erlangt (Übersicht, siehe (8,15)).

Die Glykosphingolipidzusammensetzung der Plasmamembran einer gesunden Zelle unterscheidet sich von der Zusammensetzung einer Tumorzelle (8,19). Die Glykosphingolipide an der Zelloberfläche haben veränderliche Bedeutung, z.B. für maligne Zellerkennung. Hier findet man ungewöhnliche, andernorts meist nicht oder nur in untergeordneter Menge vorkommende Glykosphingolipide. Beispiele dafür sind die Ganglioside Glac2 beim Melanom und Glioblastoma multiform oder Gfpt1 beim kleinzelligen Lungenkarzinom. Eine Erklärung oder Systematisierung dieser Befunde bleibt meistens schwierig, da in all diesen Fällen die Natur der Tumorprogenitorzellen unbekannt ist.

Dennoch scheinen sich folgende Veränderungsmöglichkeiten der Glykosphingolipidkomponentenzusammensetzungen bei maligner Zelltransformation abzuzeichnen:

1.) unvollständige Biosynthese der GSL, teilweise mit Akkumulation der Vorstufen: so wird aus GbOse₃Cer nicht GbOse₄Cer. Die Anhäufung von Gb3OseCer ist typisch für Burkitts Lymphkarzinom (128); durch die fehlende Umsetzung von Glac1 zu Glac2, von Glac2 zu Gtri2 und von Gtri2 zu Gtet2b akkumulieren sich die entsprechenden Precursor, diese gesteigerte Menge an Glac2 ist assoziiert mit Melanomen (129-133).

Tumorzellen fehlen

a) die Glykosyltransferasen,

b) wegen des kürzeren Zellzyklus die Zeit, um die Oligosaccharidkette der GSL während der Biosynthese aufzubauen.

Daher sind die GSL von Tumorzellen in ihrem Kohlenhydratteil meist kürzerkettig als die GSL von benignen Zellen (12,134).

2.) Durch Aktivierung von inaktiven Glykosyltransferasen werden Glykosphingolipide (z.B. Fukolipide (135-143) oder Fukoganglioside (56,58,144,145)) synthetisiert, die in vergleichbaren, gutartigen Zellen nicht vorkommen.

Bei der Metastasierung werden Zellen des Primärtumors in das Blutsystem abgegeben und zirkulieren durch den gesamten Organismus. Durch initialen Kontakt zwischen diesen Tumorzellen und Epithelzellen der Blutgefäßwand durch Wechselwirkung via GSL kommt es dann zur Adhäsion der Tumorzellen an die Blutgefäßwand und Invasion in das umliegende Gewebe und anschließend zur Bildung von Metastasen durch Wechselwirkungen der Tumorzellen und den benignen Zellen des Gewebes, erneut via GSL (146).

Da es sich hierbei um dynamische Vorgänge handelt, scheint es notwendig, über die zahlreichen Bindungsversuche unter statischen Bedingungen hinauszugehen. Zumal die Gleichgewichtsdialyse und die Adhäsionsversuche von Kojima et al. (79,147,148), der Glykosphingolipidliposomen und Zellen **im Fluß** über eine mit Glykosphingolipiden beschichtete Plastikoberfläche gegeben hat, deutlich gemacht haben, daß bei der Zelladhäsion via Glykosphingolipide zwischen statischen und dynamischen Systemen enorme Differenzen bestehen. So werden z.B. die physiologischen Bedingungen (Scherkräfte durch Bewegung) bei den statischen Adhäsionsexperimenten nicht berücksichtigt.

Der oben beschriebene Ablauf der Metastasierung legt die Vermutung nahe, daß es auch Bindestellen für bestimmte Kohlenhydrate gibt. Um diese Bindestellen zu finden, steht man vor

der Notwendigkeit, ein Glykokonjugat, das seinen Bindeort zu erkennen gibt, zur Verfügung zu haben.

Die Interaktion zwischen Kohlenhydraten und kohlenhydratbindenden Molekülen ist oft multivalent (149) und/oder schwach (64,65,150). Kompensiert werden kann dies durch die Multivalenz des kohlenhydrattragenden Reagenz'.

Schon von anderen Zelladhäsionsmolekülen ist dieser "Cluster-Effekt" bekannt: polyvalente Glykokonjugate haben eine viel höhere Affinität zu dem entsprechenden kohlenhydratbindenden Molekül als monovalente Glykokonjugate (32,62,66,151).

Das Reagenz, an das die Kohlenhydratepitope gekoppelt sind, darf keine Funktionalitäten mehr haben, da diese eine eigene Wechselwirkung mit den Zellen eingehen und so die ohnehin schwache Wechselwirkung zwischen Glykosphingolipid und einem potentiellen Bindungspartner überdecken könnten. Trägt beispielsweise das Untersuchungsreagenz neben der Kohlenhydratkette eine Ladung, so können die beobachteten Effekte sowohl von der Oligosaccharidkette, als auch von der Ladung hervorgerufen worden sein.

Um den Kohlenhydratteil möglichst wenig zu modifizieren, ist die Markergruppe an das Trägermolekül gekuppelt worden. Zugleich ist so die Funktionalität, die auch für eine Wechselwirkung geeignet sein könnte, aus dem Molekül herausgenommen worden.

Um die Carboxylgruppen der Glutaryl-glutaminsäure zur Kupplung bereit zu machen, wurden die Carboxylgruppen durch Veresterung aktiviert, s. Abbildung 15.

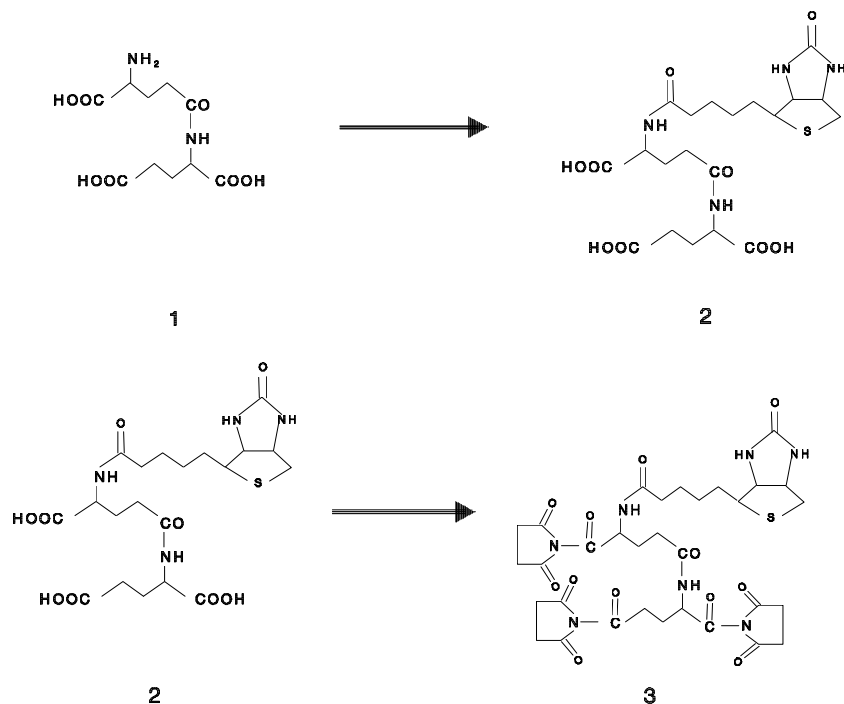


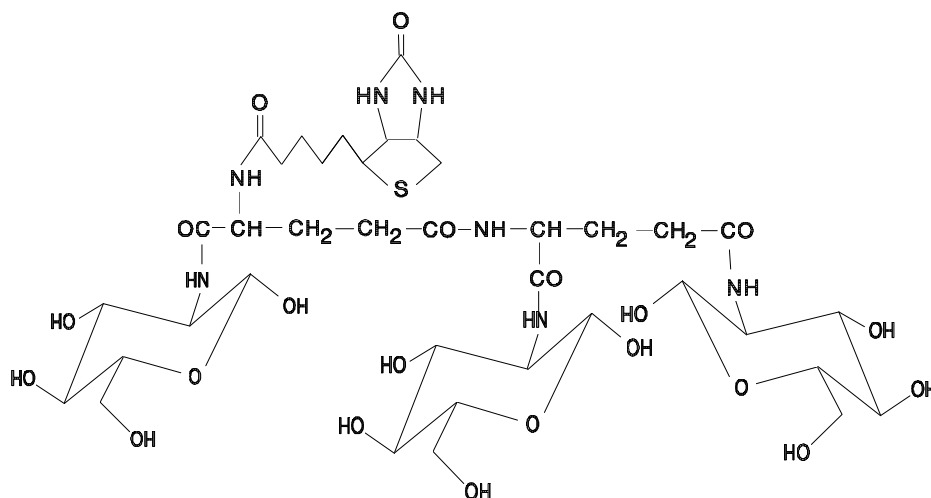
Abb. 15: Reaktionsschema zur Umwandlung von γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure in (2'-N'-Biotinyl)- γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-trisuccinimidester (**3**)

Schließlich wurde dieser Ester mit geeigneten Kohlenhydraten/kohlenhydrattragenden Molekülen umgesetzt.

Dazu mußten auch die Kohlenhydratligenanden kupplungsfähig sein; um mit einem Carboxylgruppenester gekuppelt zu werden, sollte das Kohlenhydrat eine primäre Aminogruppe besitzen.

Um dies zu erreichen, wurden zwei Wege beschritten:

A) es wurde kommerziell erhältliches Glukosamin eingesetzt und mit dem (2'-N'-Biotinyl)- γ -L-Glutamyl-L-glutaminsäure-trisuccinimidester (**3**) umgesetzt.



8

Abb. 16: Synthese von Glykokonjugat (8) aus Umsetzung von (3) mit Glukosamin

Dieses Glykokonjugat dürfte aber kaum für Adhäsionsversuche geeignet sein, da bekannt ist, daß ein Spacermolekül zwischen Kohlenhydrat und Trägermolekül die Effektivität der Bindung des Glykokonjugats an eine Kohlenhydratbindestelle stark erhöht (64) und die Synthese eines multivalenten Konjugats erleichtert (152).

B) Das Kohlenhydrat wurde nicht direkt eingesetzt, sondern es wurde ein kohlenhydrattragendes Molekül benutzt.

Zur Konstruktion eines Konjugats mit einem Glykosphingolipid war es allerdings nötig, das Glykosphingolipid zuerst in eine Form zu bringen, in der es kovalent an ein Trägermolekül gebunden werden konnte.

Dazu mußte es so derivatisiert werden, daß eine Funktionalität entstand, die eine Kupplung ermöglichte (s. Abb. 17).

Natürlich durften diese Modifikationen nicht zu einer Veränderung der Oligosaccharidkette führen, denn dies hätte eine

Veränderung der Information bedeutet und hätte damit dem Ergebnis von vornherein jede Aussagekraft genommen. So war bekannt, daß durch die Derivatisierung des Kohlenhydrates die Bindungsfähigkeit eingeschränkt wird bzw. verloren geht (153). Um die Information, die in der Oligosaccharidkette enthalten ist, nicht zu verändern, war es daher unerlässlich, das Glykosphingolipid im Ceramidteil zu derivatisieren. Hierfür stellt die Doppelbindung im Sphingosin den idealen Ausgangspunkt dar. Durch ozonolytische Spaltung, reduktive Aufarbeitung und Reduktaminierung des entstehenden Aldehyds ließ sich hier eine Aminofunktion generieren.

Dadurch daß die Ozonolyse in Methanol ausgeführt wurde, kam es nicht zur Bildung des Ozonids, sondern das Primärozonid zerfiel in Methoxyhydroperoxid und Aldehyd (74).

Das intermediär entstehende 2-Hydroxy-3-aminoacyl-4-O-glykosid-butanal (s. Abb. 17, I) ist nur im Neutralen und Sauren stabil; unter alkalischen Bedingungen tautomerisiert das 2-Hydroxy-3-aminoacyl-4-O-glykosid-butanal zum Enolat, und der Kohlenhydratteil wird eliminiert (154-158). Ist die Oligosaccharidkette abgespalten, wird zwar auch eine Aminogruppe generiert, allerdings geht dabei die Pyranoseform des reduzierenden Zuckers verloren, weil das intermediär entstehende Enamin kein Halbacetal bilden kann (159-161).

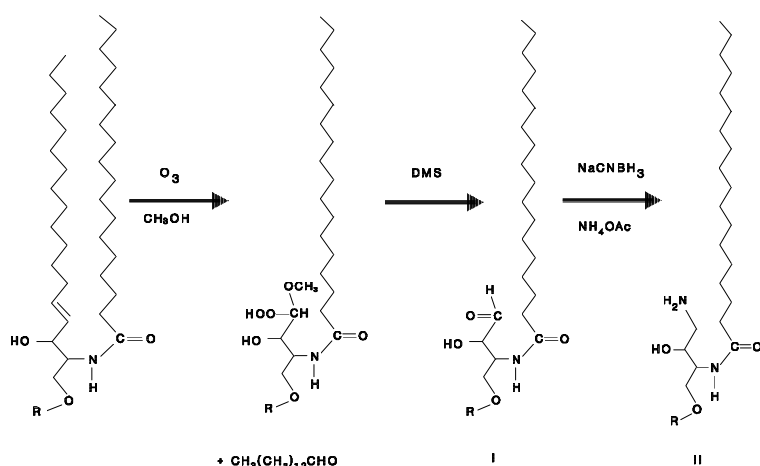


Abb. 17: allgemeines Schema der Reduktaminierung eines Glykolipids

Exemplarisch wurde hier Galaktosylcerebrosid eingesetzt, da dieses GSL einfach zugänglich ist und leicht in größeren Mengen isoliert werden kann.

Bei der Reduktaminierung entsteht aus dem Sphingosin das 1-Amino-2-hydroxy-3-aminoacyl-4-O-glykosid-butanol (Abb. 17, II).

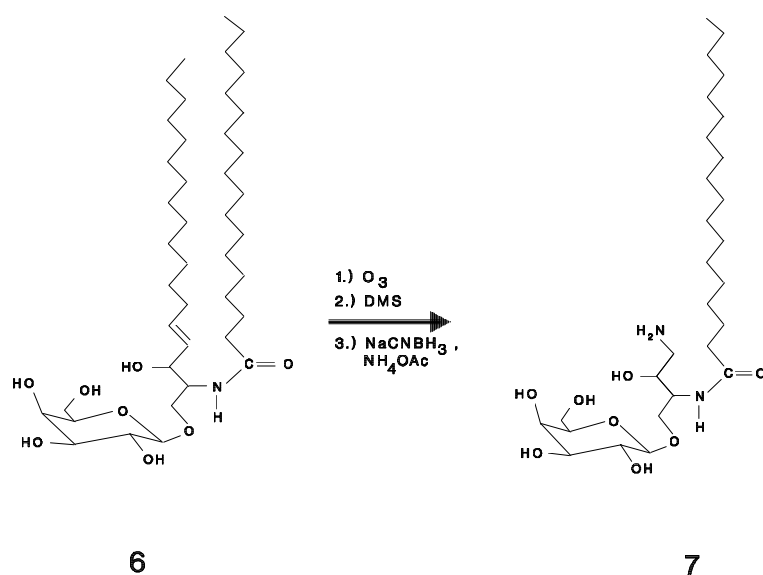
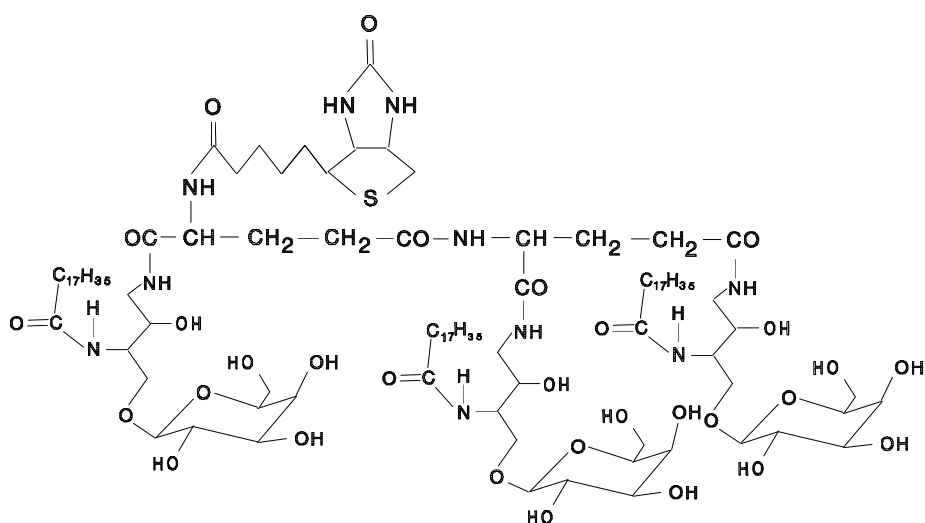


Abb. 18: Darstellung von reduktaminiertem Galaktosylcerebrosid (7)

Nun, da sowohl Trägermolekül als auch Kohlenhydratligand für die Kupplung vorbereitet waren, wurden die beiden zusammengegeben und es entstand das Glykokonjugat (10), s. Abb. 19.



10

Abb. 19: Synthese von Glykokonjugat (10) aus (3) und (7)

Diese Glykokonjugate können mehrfach genutzt werden:

- a) Konjugate bei denen Kohlenhydrate an Proteine oder Peptide gekuppelt worden sind, werden benutzt, um Antikörper zu gewinnen (162-165). Durch die Kupplung wird die schwache Immunogenität der Glykosphingolipide entscheidend gesteigert;
- b) teilweise werden auch die Kohlenhydrate an Polymere gebunden, um so Lektine oder Kohlenhydratbindende Organismen zu isolieren (104,166-167).
- c) Bei diesen Konjugaten spielt es anscheinend eine entscheidende Rolle für die Bindungsaffinität, wie die Kohlenhydrate gebunden sind, bzw. welche Struktur die Konjugate haben (168). Wie schon oben erwähnt, verbessert eine Spacergruppe zwischen Kohlenhydrat und Trägermolekül die Affinität ganz enorm (64).

Es wird eine Aufgabe der Zukunft sein, die beiden in dieser Arbeit synthetisierten Kohlenhydratkongjugate darauf zu testen, für welchen Zweck sie am besten geeignet sind.

5. LITERATUR

1. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, (1977) The Nomenclature of Lipids. *Lipids* **12**, 455-468
2. Wiegandt, H. (1973) Gangliosides of extraneural organs. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 1049-1056
3. Kobata, A. and Ginsburg, V. (1969) Oligosaccharides of human milk; isolation and characterization of a new pentasaccharide, lacto-N-fucopentaose III. *J. Biol. Chem.* **244:20**, 5496-5502
4. Kobata, A., Yamashita, K., and Tachibana, Y. (1991) Oligosaccharides from human milk. *Methods Enzymol.* **50**, 216-220
5. Holmes, E.H. and Greene, T.G. (1991) Isolation and fine-structure characterization of four monoclonal antibodies reactive with glycoconjugates containing terminal GlcNAc residues - application to aspects of lacto-series tumor antigen biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 87-96
6. Jungalwala, F.B., Chou, D.K.H., Suzuki, Y., and Maxwell, G.D. (1992) Temporal expression of HNK-1-reactive sulfoglucuronyl glycolipid in cultured quail trunk neural crest cells: comparison with other developmentally regulated glycolipids. *J. Neurochem.* **58**, 1045-1051
7. Nair, S.M., Prasadaraio, N., Tobet, S.A., and Jungalwala, F.B. (1993) Rostrocaudal expression of antibody HNK-1-reactive glycolipids in mouse cerebellum: relationship to developmental compartments and leaner mutation. *J. Comp. Neurol.* **332**, 282-292
8. Hakomori, S. (1985) Aberrant glycosylation in cancer cell membranes as focused on glycolipids: overview and perspectives. *Cancer Res.* **45**, 2405-2414

9. Holmes, E.H. and Greene, T.G. (1993) De novo synthesis of type I lacto-series glycolipids in human colonic adenocarcinoma cells: efficient synthesis of the Le a antigen and absence of brefeldin A-induced inhibition of its synthesis in colo 205 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 328-340
10. Rauvala, H. and Finne, J. (1979) Structural similarity of the terminal carbohydrate sequences of glycoproteins and glycolipids. *FEBS Letters* **97**, 1-8
11. Tonegawa, Y. and Hakomori, S. (1977) "Ganglioprotein and globoprotein": the glycoproteins reacting with anti-ganglioside and anti-globoside antibodies and the ganglioprotein change associated with transformation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **76**, 9-17
12. Wiegandt, H. (1989) in *Gangliosides and cancer*. Oettgen, H.F., ed.), 2nd Ed., pp. 6-15. VCH, Weinheim
13. Kanfer, J.N. and Hakomori, S. (1983) in *Handbook of lipid research*. Hanahan, D.J., ed.), 3rd Ed., pp. 485. Plenum Press, New York-London
14. Hakomori, S. (1993) Structure and function of sphingoglycolipids in transmembrane signaling and cell-cell interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 583-595
15. Hakomori, S. (1981) Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 733-764
16. Ashwell, G. and Harford, J. (1982) Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 531-554
17. Gabius, H.-J. (1991) Detection and functions of mammalian lectins - with emphasis on membran lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **1071**, 1-18

18. Molin, K., Fredman, P., and Svennerholm, L. (1986) Binding specificities of the lectins PNA, WGA and UEA I to polyvinylchloride-adsorbed glycosphingolipids. *FEBS Letters* **205**, 51-55
19. Monsigny, M., Kieda, C., and Roche, A.-C. (1983) Membran glycoproteins and membrane lectins as recognition signals in normal and malignant cells. *Biol. Cell* **47**, 95-110
20. Kisfaludy, L. and Schön, I. (1983) Preparation and applications of pentafluorophenylesters of 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids for peptide synthesis. *Synthesis* **1983**, 325-327
21. Chadli, A., Caron, M., Tichá, M., Joubert, R., Bladier, D., and Kocourek, J. (1992) Development of screening methods for detection of carbohydrate-binding proteins by using soluble glycosylated polyacrylamide-based copolymers. *Anal. Biochem.* **204**, 198-203
22. Horejsi, V., Smolek, P., and Kocourek, J. (1978) XXXV. Water-soluble O-glycosyl polyacrylamide derivatives for specific precipitation of lectins. *Biochim. Biophys. Acta* **538**, 293-298
23. Kaku, H., Mori, Y., Goldstein, I.J., and Shibuya, N. (1993) Monomeric, monovalent derivative of MAACKIA AMURENSIS leucoagglutinin; preparation and application to the study of cell surface glycoconjugates by flow cytometry. *J. Biol. Chem.* **268**, 13237-13241
24. Barondes, S.H. (1981) Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev. Biochem.* **50**, 207-231

25. Bhattacharyya, L., Fant, J., Lonn, H., and Brewer, C.F. (1990) Binding and precipitating activities of LOTUS TETRAGONOLOBUS isolectins with L-fucosyl oligosaccharides. Formation of unique homogeneous cross-linked lattices observed by electron microscopy. *Biochemistry* **29**, 7523-7530
26. Matsumoto, I. and Osawa, T. (1974) Specific purification of eel serum and CYTIUS SESSILIFOLIUS anti-H hemagglutinins by affinity chromatography and their binding to human erythrocytes. *Biochemistry* **3**, 582-587
27. Schnaar, R.L. and Lee, Y.C. (1975) Polyacrylamide gels copolymerized with active esters. A new medium for affinity systems. *Biochemistry* **14**, 1535-1541
28. Kamemura, K., Furuichi, Y., Umekawa, H., and Takahashi, T. (1993) Purification and characterization of a novel lectin from great northern bean, PHASEOLUS VULGARIS L. *Biochim. Biophys. Acta* **1158**, 181-188
29. Smith, D.F. (1983) Glycolipid-lectin interactions: detection by direct binding of ¹²⁵I-lectins to thin layer chromatograms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **115**, 360-367
30. Mandrell, R.E., Apicella, M.A., Lindstedt, R., and Leffler, H. (1994) Possible interaction between animal lectins and bacterial carbohydrates. *Methods Enzymol.* **236**[17], 231-254
31. Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., Osawa, T., and Sharon, N. (1980) What should be called a lectin ? *Nature* **285**, 66
32. Lee, Y.C., Townsend, R.R., Hardy, M.R., Lönnngren, J., Arnarp, J., Haraldsson, M., and Lönn, H. (1983) Binding of synthetic oligosaccharides to hepatic Gal/GalNAc lectin. *J. Biol. Chem.* **258**, 199-202

33. Caron, M., Joubert, R., and Bladier, D. (1987) Purification and characterization of a β -galactoside-binding soluble lectin from rat and bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta* **925**, 290-296
34. Rogerieux, F., Belaise, M., Terzidis-Trabelsi, H., Greffard, A., Pilatte, Y., and Lambre, C.R. (1993) Determination of the sialic acid linkage specificity of sialidases using lectins in a solid phase assay. *Anal. Biochem.* **211**, 200-204
35. Kielczynski, W. and Harrison, L.C. (1990) Detection of gangliosides by direct binding of *Limax flavus* agglutinin to thin layer chromatograms. *Glycoconjugate J.* **7**, 75-84
36. Dam, T.K., Sarkar, M., Ghosal, J., and Choudhury, A. (1993) Purification and partial characterization of a N-glycolylneuraminic acid specific lectin from the clam ANADARA GRANOSA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **196**, 422-429
37. van Heyningen, W.E. (1974) Gangliosides as membran receptors for tetanus toxin, cholera toxin and serotonin. *Nature* **249**, 415-417
38. Hudgin, R.L., Pricer, W.E., Ashwell, G., Stockert, R.J., and Morell, A.G. (1974) The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoproteins. *J. Biol. Chem.* **249**, 5536-5543
39. Herrmann, J., Turck, C.W., Atchison, R.E., Huflejt, M.E., Poulter, L., Gitt, M.A., Burlingame, A.L., Barondes, S.H., and Leffler, H. (1993) Primary structure of the soluble lactose binding lectin L-29 from rat and dog and interaction of its non-collagenous proline-, glycine, tyrosine-rich sequence with bacterial and tissue collagenase. *J. Biol. Chem.* **268**, 26704-26711

40. Barondes, S.H. (1988) Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 480-482
41. Gabius, H.-J. (1997) Animal lectins. *Eur. J. Biochem.* **243**, 543-576
42. Ni, Y. and Tizard, I. (1996) Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. *Vet. Immun. Immunopathol.* **55**, 205-223
43. Powell, L.D. and Varki, A. (1995) I-type lectins. *J. Biol. Chem.* **270**, 14243-14246
44. Hakomori, S. (1994) in *Progress in Brain Research, Vol. 101*. Svennerholm, L., Asbury, A.K., Reisfeld, R.A., Sandhoff, K., Suzuki, K., Tettamanti, G., and Toffano, G., eds.), pp. 241-250. Elsevier, New York
45. Kojima, N. and Hakomori, S. (1991) Synergistic effect of two cell recognition systems: glycosphingolipid-glycosphingolipid interaction and integrin receptor interaction with pericellular matrix protein. *Glycobiology* **1**, 623-630
46. Kojima, N., Shiota, M., Sadahira, Y., Handa, K., and Hakomori, S. (1992) Cell adhesion in a dynamic flow system as compared to static system glycosphingolipid-glycosphingolipid interaction in the dynamic system predominates over lectin- or integrin-based mechanisms in adhesion of B16 melanoma cells to non activated endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 17264-17270
47. Zheng, M., Fang, H., Tsuruoka, T., Tsuji, T., Sasaki, T., and Hakomori, S. (1993) Regulatory role of GM3 ganglioside in $\alpha 5\beta 1$ integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA 169 cells. *J. Biol. Chem.* **268**, 2217-2222

48. Barletta, E., Mugnai, G., and Ruggieri, S. (1993) Complex gangliosides modulate the integrin-mediated adhesion in a rat hepatoma cell-line. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **192**, 214-222
49. Feizi, T. (1991) Carbohydrate differentiation antigens - probable ligands for cell adhesion molecules. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 84-86
50. Moore, K.L., Varki, A., and McEver, R.P. (1991) GMP-140 binds to a glycoprotein receptor on human neutrophils -evidence for a lectin-like interaction. *J. Cell Biol.* **112:3**, 491-499
51. Song, W.X., Vacca, M.F., Welte, R., and Rintoul, D.A. (1991) Effects of gangliosides GM3 and de-N-acetyl GM3 on epidermal growth factor receptor kinase activity and cell growth. *J. Biol. Chem.* **266**, 10174-10181
52. Zhou, Q., Moore, K.L., Smith, D.F., Varki, A., McEver, R.P., and Cummings, R.D. (1991) The selectin GMP-140 binds to sialylated, fucosylated lactosaminoglycans on both myeloid and nonmyeloid cells. *J. Cell Biol.* **115:2**, 557-564
53. Shukla, G.S., Shukla, A., and Radin, N.S. (1991) Gangliosides inhibit glucosylceramide synthase: a possible role in ganglioside therapy. *J. Neurochem.* **56**, 2125-2132
54. Needham, L.K. and Schnaar, R.L. (1993) The HNK-1 reactive sulfoglucuronyl glycolipids are ligands for L-selectin and P-selectin but not E-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1359-1363

55. Foxall, C., Watson, S.R., Dowbenko, D., Fennie, C., Lasky, L.A., Kiso, M., Hasegawa, A., Asa, D., and Brandley, B.K. (1992) The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis x oligosaccharide. *J. Cell Biol.* **117**, 895-902
56. Takada, A., Katsuyuki, O., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, A., Zenita, K., Hasegawa, A., and Kannagi, R. (1991) Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis a. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **179:2**, 713-719
57. Kojima, N., Handa, K., Newman, W., and Hakomori, S. (1992) Inhibition of selectin-dependent tumor cell adhesion to endothelial cells and platelets by blocking O-glycosylation of these cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **182**, 1288-1295
58. Majuri, M.-L., Mattila, P., and Renkonen, R. (1992) Recombinant E-selectin-protein mediates tumor cell adhesion via sialyl-Le a and sialyl-Le x. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **182**, 1376-1382
59. Larkin, M., Ahern, T.J., Stoll, M.S., Shaffer, M., Sako, D., O'Brien, J., Yuen, C.-T., Lawson, A.M., Childs, R.A., Barone, K.M., Langer-safer, P.R., Hasegawa, A., Kiso, M., Larsen, G.R., and Feizi, T. (1992) Spectrum of sialylated and nonsialylated fuco-oligosaccharides bound by the endothelial-leucocyte adhesion molecule E-selectin. *J. Biol. Chem.* **267**, 13661-13668
60. Zheng, M., Tsuruoka, T., Tsuji, T., and Hakomori, S. (1992) Regulatory role of GM3 ganglioside in integrin function, as evidenced by its effect on function of $\alpha 5 \beta 1$ -liposomes: a preliminary note. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **186**, 1397-1402

61. Erbe, D.V., Wolitzky, B.A., Presta, L.G., Norton, C.R., Ramos, R.J., Burns, D.K., Rumberger, J.M., Narasinga Rao, B.N., Foxall, C., Brandley, B.K., and Lasky, L.A. (1992) Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. *J. Cell Biol.* **119**, 215-227
62. Ogino, M., Tatum, A.H., and Latov, N. (1994) Affinity studies of human anti-MAG antibodies in neuropathy. *J. Neuroimmunol.* **52**, 41-46
63. Takeichi, M. (1988) The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* **102**, 639-655
64. Roy, R. (1996) Blue-Prints, synthesis and applications of glycopolymers. *Trends Glycosci. Glycotech.* **8**, 79-99
65. Spillmann, D. (1994) Carbohydrates in cellular recognition: from leucine-zipper to sugar-zipper. *Glycoconjugate J.* **11**, 169-171
66. Weitz-Schmidt, G., Stokmaier, D., Scheel, G., Nifant'ev, N.E., Tuzikov, A.B., and Bovin, N.V. (1996) An E-selectin binding assay based on a polyacrylamide-type glycoconjugate. *Anal. Biochem.* **238**, 184-190
67. Adler, P., Wood, S.J., Lee, Y.C., Petri Jr., W.A., and Schnaar, R.L. (1994) High affinity binding of the ENTAMOEBA HISTOLYTICA lectin to polyvalent N-acetylgalactosaminides. *J. Biol. Chem.* **270**, 5164-5171
68. Karlsson, K.-A. (1970) Sphingolipid long chain bases. *Lipids* **5**, 878-891
69. Waldi, D. (1962) in *Dünnschichtchromatographie: Ein Laboratoriumshandbuch*. Stahl, E., ed.), pp. 496-515. Springer, Berlin-Heidelberg

70. Busam, K. and Decker, K. (1986) Ganglioside biosynthesis in rat liver characterization of three sialyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **160**, 23-30
71. Reindel, F. and Hoppe, W. (1954) . *Chem. Ber.* **87**, 1103-1107
72. Lapidot, Y., Rappoport, S., and Wolman, Y. (1967) Use of esters of N-hydroxysuccinimide in the synthesis of N-acyloamino acids. *J. Lipid Res.* **8**, 142-145
73. Ong, D.E. and Brady, R.N. (1972) Synthesis of ceramides using N-hydroxysuccinimide esters. *J. Lipid Res.* **13**, 819-822
74. Criegee, R. and Lohaus, G. (1953) Die Ozonisierung vierfach symmetrisch substituierter Äthylene. *Ann. Chem.* **583**, 6-12
75. Pappas, J.J., Keaveney, W.P., Gaucher, E., and Melvin, B. (1966) A new and convenient method for converting olefins to aldehyds. *Tetrahedron Letters* **36**, 4273-4278
76. Spillmann, D. and Burger, M.M. (1996) Carbohydrate-carbohydrate interactions in adhesion. *J. Cell. Biochem.* **61**, 562-568
77. Fenderson, B.A., Zehavi, U., and Hakomori, S. (1984) A multivalent lacto-N-fucopentaoseIII-lysyllysine conjugate decompacts preimplantation mouse embryos, while the free oligosaccharide is ineffective. *J. Exp. Med.* **160**, 1591-1596
78. Bird, J.M. and Kimber, S.J. (1984) Oligosaccharides containing fucose linked $\alpha(1-3)$ and $\alpha(1-4)$ to N-acetylglucosamine cause decompaction of mouse morulae. *Dev. Biol.* **104**, 449-460

79. Kojima, N. and Hakomori, S. (1991) Cell adhesion, spreading, and motility of GM3-expressing cells based on glycolipid-glycolipid interaction. *J. Biol. Chem.* **266**, 17552-17558
80. Hakomori, S. (1991) Carbohydrate-carbohydrate interaction as an initial step in cell recognition. *Pure Appl. Chem.* **63**, 473-482
81. Eggens, I., Fenderson, B.A., Toyokuni, T., Dean, B., Stroud, M., and Hakomori, S. (1989) Specific interaction between Le x and Le x determinants. *J. Biol. Chem.* **264**, 9476-9484
82. Kojima, N. and Hakomori, S. (1989) Specific interaction between gangliosylceramide (Gg3) and sialosyl-lactosylceramide (GM3) as a basis for specific cellular recognition between lymphoma and melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 20159-20162
83. Stewart, R.J. and Boggs, J.M. (1993) A carbohydrate-carbohydrate interaction between galactosylceramide-containing liposomes and cerebroside sulfate-containing liposomes: dependence on the glycolipid ceramide composition. *Biochemistry* **32**, 10666-10674
84. Koshy, K.M. and Boggs, J.M. (1996) Investigation of the calcium-mediated association between the carbohydrate head group of galactosylceramide and galactosylceramide I3 sulfate by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **271**, 3496-3499
85. Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., and Popko, B. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: Normal structure with abnormal function and instability. *Cell* **86**, 209-219

86. Nyholm, P.-G. and Pascher, I. (1993) Orientation of the saccharide chains of glycolipids at the membrane surface: conformational analysis of the glucose-ceramide and the glucose-glyceride linkages using molecular mechanics (MM3). *Biochemistry* **32**, 1225-1234
87. Karlsson, K.-A. (1989) Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria. *Ann. Rev. Biochem.* **58**, 309-350
88. Cuatrecasas, P. (1973) Interaction of *Vibrio cholerae* enterotoxin with cell membranes. *Biochemistry* **12**, 3547-3558
89. Cuatrecasas, P. (1973) Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin. *Biochemistry* **12**, 3558-3566
90. Kitamura, M., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1980) Interactions between *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* neurotoxin and gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* **628**, 328-335
91. Simpson, L.L. and Rapport, M.M. (1971) Ganglioside inactivation of botulinum toxin. *J. Neurochem.* **18**, 1341-1343
92. Ledley, F.D., Lee, G., Kohn, L.D., Habig, W.H., and Hardgree, M.C. (1977) Tetanus toxin interactions with tyroid plasma membranes. Implication for structure and function of tetanus toxin receptors and potential pathophysiological significance. *J. Biol. Chem.* **252**, 4049-4055
93. Holmgren, J., Elwing, H., Fredman, P., Strannegard, O., and Svennerholm, L. (1980) Gangliosides as receptors for bacterial toxins and Sendai virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* **125**, 453-470

94. Calvo, F.O. and Ryan, R.J. (1985) Inhibition of adenyl cyclase activity in rat corpora luteal tissue by glycopeptides of human chorionic gonatropin and the α -subunit of human chorionic gonatropin. *Biochemistry* **24**, 1953
95. Lee, G., Aloj, S.M., Brady, R.O., and Kohn, L.D. (1976) The structure and function of glycoprotein hormone receptors: ganglioside interaction with human chorionic gonotropin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **73**, 370-377
96. Lee, G., Aloj, S.M., and Kohn, L.D. (1977) The structure and function of glycoprotein hormone receptors: ganglioside interactions with luteinizing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **77**, 434-441
97. Mullin, B.R., Fishman, P.H., Lee, G., Aloj, S.M., Ledley, F.D., Winand, R.J., Kohn, L.D., and Brady, R.O. (1976) Thyrotropin-ganglioside interactions and their relationship to the structure and function of thyrotropin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 842-846
98. Helling, F., Shang, A., Calves, M., Zhang, S., Ren, S., Yu, R.K., Oettgen, H.F., and Livingston, P.O. (1994) GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res.* **54**, 197-203
99. Deal, C.D. and Krivan, H.C. (1990) Lacto-and ganglio-series glycolipids are adhesion receptors for NEISSERIA GONORRHOEAE. *J. Biol. Chem.* **265**, 12274-12777
100. Stromberg, N., Deal, C., Nyberg, G., Normark, S., So, M., and Karlsson, K.-A. (1988) Identification of carbohydrate structures that are possible receptors for NEISSERIA GONORRHOEAE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 4902-4906

101. Kamisago, S., Iwamori, M., Tai, T., Mitamura, K., Yazaki, Y., and Sugano, K. (1996) Role of sulfatides in adhesion of *HELICOBACTER PYLORI* to gastric cancer cells. *Infection Immunity* **64**, 624-628
102. Saitoh, T., Natomi, H., Zhao, W., Okuzumi, K., Sugano, K., Iwamori, M., and Nagai, Y. (1991) Identification of glycolipid receptors for *HELICOBACTER PYLORI* by TLC-immunostaining. *FEBS Letters* **282**, 385-387
103. Kingery-Wood, J.E., Williams, K.W., Sigal, G.B., and Whitesides, G.M. (1992) The agglutination of erythrocytes by influenza virus is strongly inhibit by liposomes incorporating an analog of sialyl gangliosides. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7303-7305
104. Matrosovich, M.N., Mochalova, L.V., Marinima, V.P., Byramova, N.E., and Bovin, N.V. (1990) Synthetic polymeric sialoside inhibitors of influenza virus receptor-binding activity. *FEBS Letters* **272**, 209-212
105. Matrosovich, M.N., Miller-Podraza, H., Teneberg, S., Robertson, J., and Karlsson, K.-A. (1996) Influenza viruses high-affinity binding to human poly-glycosylceramides represented on a solid-phase assay surface. *Virology* **223**, 413-416
106. Mizrachi, Y. (1993) Neural cell receptor for HIV-1. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **693**, 320-323
107. Long, D., Berson, J.F., Cook, D.G., and Doms, R.W. (1994) Characterization of human immunodeficiency virus type 1 gp 120 binding to liposomes containing galactosyl-ceramide. *J. Virol.* **68**, 5890-5898

108. Cook, D.G., Fantini, J., Spitalnik, S.L., and Gonzalez-Scarano, F. (1994) Binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp 120 to galactosylceramide (GalCer): relationship to the V3 loop. *Virology* **201**, 206-214
109. Kayser, K., Bovin, N.V., Wiegandt, H., Andre, S., Gabius, S., Zeng, F.-Y., Gabius, H.-J. (1994) Labelled neoglycoconjugates: neoglycoproteins and other biotinylated carriers of bioactive ligands in morphological diagnosis. *Arg. Pathol.* **26**, 19-26
110. Yahi, N., Sabatier, J.M., Nickel, P., Mabrouk, K., Gonzalez-Scarano, F., and Fantini, J. (1994) Suramin inhibits binding of the V3 region of the HIV-1 envelope glycoprotein gp 120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp 120 on human colon epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 24349-24353
111. Yahi, N., Sabatier, J.M., Baghdiguian, S., Gonzalez-Scarano, F., and Fantini, J. (1995) Synthetic multimeric peptides derived from the principal neutralization domain (V3 loop) of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp 120 bind to galactosylceramide and block HIV-1 infection in a human CD4-negative mucosal epithel cell line. *J. Virol.* **69**, 320-325
112. Harouse, J.M., Bhat, S., Spitalnik, S.L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D.H., and Gonzalez-Scarano, F. (1991) Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **253**, 320-323
113. Fenderson, B.A., Eddy, E.M., and Hakomori, S. (1990) Glycoconjugate expression during embryogenesis and its biological significance. *BioEssays* **12**, 173-179
114. Wiegandt, H. (1987) in *Gangliosides and modulation of neuronal functions*. (Rahmann, H., ed.), pp. 37-47. NATO ASI Series Vol. H 7, Springer, Berlin-Heidelberg

115. Yamakawa, T. (1987) in *Gangliosides and modulation of neuronal functions*. (Rahmann, H., ed.), pp. 3-15. NATO ASI Series Vol. H 7, Springer, Berlin-Heidelberg
116. Yogeewaran, G. (1983) Cell surface glycolipids and glycoproteins in malignant transformation. *Adv. Cancer Res.* **38**, 289-350
117. Yamakawa, T. and Nagai, Y. (1978) *Trends Biochem. Sci.* **3**, 128-131
118. Gillard, B.K., Thurmon, L.T., and Marcus, D.M. (1993) Variable subcellular localization of glycosphingolipids. *Glycobiology* **3**, 57-67
119. Katz, H.R. and Austen, K.F. (1986) Plasma membrane and intracellular expression of globotetraosylceramid (globoside) in mouse bone marrow-derived mast cells. *J. Immunol.* **136**, 3819-3824
120. Marcus, D.M. and Janis, R. (1970) Localization of glycosphingolipids in human tissues by immunofluorescence. *J. Immunol.* **104**, 1530-1539
121. Sakakibara, K., Momoi, T., Uchida, T., and Nagai, Y. (1981) Evidence for association of glycosphingolipid with a colchicine-sensitive microtubule-like cytoskeleton structure of cultured cells. *Nature* **293**, 76-79
122. Symington, F.W., Murray, W.A., Bearman, S.I., and Hakomori, S. (1987) Intracellular localization of lactosylceramide, the major human neutrophil glycosphingolipid. *J. Biol. Chem.* **262**, 11356-11363

123. van Genderen, I.L., van Meer, G., Slot, J.W., Geuze, H.J., and Voorhout, W.F. (1991) Subcellular localization of Forssman glycolipid in epithelial MDCK cells by immunoelectronmicroscopy after freeze-substitution. *J. Cell Biol.* **115**, 1009-1019
124. Cui, Y., Noguchi, H., Kiguchi, K., Aoki, D., Susumu, N., Nozawa, S., Kawakami, H., Hirano, H., and Iwamori, M. (1993) Human cervical epidermal carcinoma-associated intracellular localization of glycosphingolipid with blood group A type 3 chain. *Jpn. J. Cancer Res.* **84**, 664-672
125. Wiegandt, H. (1968) The structure and the function of gangliosides. *Angew. Chem. int. Ed.* **7**, 87-96
126. Devant, R.M. (1992) Chemische Totalsynthese von Sphingosin, dem zentralen Baustein der Sphingolipide. *Kontakte* **3**, 11-28
127. Terzaghi, A., Tettamanti, G., and Masserini, M. (1993) Interaction of glycosphingolipids and glycoproteins: thermotropic properties of model membranes containing GM1 ganglioside and glycophorin. *Biochemistry* **32**, 9722-9725
128. Nudelman, E., Kannagi, R., Hakomori, S., Parsons, M., Lipinski, M., Wiels, J., Fellous, M., and Tursz, T. (1983) A glycolipid antigen associated with Burkitt lymphoma defined by a monoclonal antibody. *Science* **220**, 509-511
129. Gottfries, J., Percy, A.K., Mansson, J.E., Fredman, P., Wilkstrand, C.J., Friedman, H.S., Bigner, D.D., and Svennerholm, L. (1991) Glycolipids and glycosyltransferases in permanent cell lines established from human medulloblastomas. *Biochim. Biophys. Acta* **1081**, 253-261

130. Ritter, G., Boosfeld, E., Adluri, R., Calves, M., Oettgen, H.F., Old, L.J., and Livingston, P.O. (1991) Antibody response to immunization with gnglioside GD3 congeners (lactones, amide and gangliosidol) in patients with malignant melanoma. *Int. J. Cancer* **48**, 379-385
131. Ravindranath, M.H., Tsuchida, T., Morton, D.L., and Reiko, F.I. (1991) Ganglioside GM3:GD3 ratio as an index for the management of melanoma. *Cancer* **67:12**, 3029-3035
132. Ozawa, H., Kotani, M., Kawashima, I., and Tai, T. (1992) Generation of one set of monoclonal antibodies specific for b-pathway ganglio-series gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 184-190
133. Sjoberg, E.R., Manzi, A.E., Khoo, K., Dell, A., and Varki, A. (1992) Structural and immunological characterization of O-acetylated GD2 evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-acetyltransferase in human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 16200-16211
134. Hakomori, S. (1989) in *Gangliosides & Cancer*. (Oettgen, H.F., ed.), 2nd Ed., pp. 57-68. VCH Publisher, Weinheim
135. Foster, C.S., Gillies, D.R.B., and Glick, M.C. (1991) Purification and characterization of GDP-L-Fuc-N-acetyl-beta-D-glucosaminide alpha-1->3 fucosyltransferase from human neuroblastoma cells-unusual substrate specificities of the tumor enzyme. *J. Biol. Chem.* **266:6**, 3526-3531
136. Nilsson, O., Mansson, J.E., Brezicka, F.-T., Holmgren, J., Lindholm, L., Sörenson, S., Yngvason, F., and Svennerholm, L. (1984) Fucosyl-GM1 - A ganglioside associated with small cell lung carcinomas. *Glycoconjugate J.* **1**, 43-49

137. Brezicka, F.-T., Olling, S., Nilsson, O., Bergh, J., Holmgren, J., Sörenson, S., Yngvason, F., and Lindholm, L. (1989) Immunohistological detection of Fucosyl-GM1 ganglioside in human lung cancer and normal tissues with monoclonal antibodies. *Cancer Res.* **49**, 1300-1307
138. Nilsson, O., Brezicka, F.-T., Holmgren, J., Sörenson, S., Svennerholm, L., Yngvason, F., and Lindholm, L. (1986) Detection of a ganglioside antigen associated with small cell lung cacinomas using monoclonal antibodies directed against Fucosyl-GM1. *Cancer Res.* **46**, 1403-1407
139. Matsuzaki, H., Hata, H., Asou, N., Yoshida, M., Matsuno, F., Takeya, M., Yamaguchi, K., Sanada, I., and Takatsuki, K. (1992) Human T-cell leukemia virus-1-positive cell line established from a patient with small cell lung cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* **83**, 450-457
140. Holmes, E.H. (1992) Presence of an essential lysine residue in a GDP-fucose protected site of the α 1- \rightarrow 3 fucosetransferase from human small cell lung carcinoma NCI-H69 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 562-568
141. Yoshino, H., Ariga, T., Latov, N., Miyatake, T., Kushi, Y., Kasama, T., Handa, S., and Yu, R.K. (1993) Fucosyl-GM1 in human sensory nervous tissue is a target antigen in patients with autoimmune neuropathies. *J. Neurochem.* **61**, 658-663
142. deVries, T., Norberg, T., Lönn, H., and vandenEijnden, D.H. (1993) The use of human milk fucosyltransferase in the synthesis of tumor-associated trimeric X determinants. *Eur. J. Biochem.* **216**, 769-777
143. Hakomori, S. (1986) Tumor-associated glycolipid antigens, their metabolism and organization. *Chem. Phys. Lipids* **42**, 209-233

144. Jagirdar, J., Thung, S.N., Shah, K.D., Nudelman, E., Singhal, A., and Paronetto, F. (1992) Expression of sialylated Lewis x antigen in chronic and neoplastic liver diseases. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **116**, 643-648
145. Hanisch, F-G., Hanski, C., and Hasegawa, A. (1992) Sialyl Lewis x antigen as defined by monoclonal antibody AM-3 is a marker of dysplasia in the colonic adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Res.* **52**, 3138-3144
146. Hakomori, S. (1996) Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* **56**, 5309-5318
147. Kojima, N. (1992) Glycosphingolipid-Glycosphingolipid interaction: a model for a new type of cell recognition system. *Trends Glycosci. Glycotech.* **4**, 491-503
148. Kojima, N., Handa, K., Newman, W., and Hakomori, S. (1992) Multi-recognition capability of E-selectin in a dynamic flow system, as evidenced by differential effects of sialidases and anti-carbohydrate antibodies on selectin-mediated cell adhesion at low vs. high wall shear stress: a preliminary note. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **189**, 1686-1694
149. DeFrees, S.A., Philipps, L., Guo, L., and Zalipsky, S. (1996) Sialyl Lewis X liposomes as a multivalent ligand and inhibitor of E-selectin mediated cellular adhesion. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6101-6104
150. Crocker, P.R. and Feizi, T. (1996) Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 679-691

151. Connolly, D.T., Townsend, R.R., Kawaguchi, K., Bell, W.R., and Lee, Y.C. (1982) Binding and endocytosis of cluster glycosides by rabbit hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **257**, 939-945
152. Lee, R.T., Lin, P., and Lee, Y.C. (1984) New synthetic cluster ligands for galactose/N-acetylgalactosamine-specific lectin of mammalian liver. *Biochemistry* **23**, 4255-4261
153. Puri, K.D. and Springer, T.A. (1996) A schiff base with mildly oxidized carbohydrate ligands stabilizes L-selectin and not P-selectin or E-selectin rolling adhesions in shear flow. *J. Biol. Chem.* **271**, 5404-5413
154. Wiegandt, H. and Ziegler, W. (1974) Synthetic glycolipids containing glycosphingolipid-derived oligosaccharides. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 11-18
155. Borch, R.F., Bernstein, M.D., and Durst, H.D. (1971) The cyanohydridoborate anion as a selective reducing agent. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2897-2904
156. Schwartz, B.A. and Gray, G.R. (1977) Proteins containing reductively aminated dissacharides - Synthesis and chemical characterization. *Arch. Biochem. Biophys.* **181**, 542-549
157. Wiegandt, H. and Baschang, G. (1965) Die Gewinnung des Zuckeranteils der Glykosphingolipide durch Ozonolyse und Fragmentierung. *Z. Naturforsch.* **20 b**, 164-166
158. Gray, G.R. (1974) The direct coupling of oligosaccharides to proteins and derivatized gels. *Arch. Biochem. Biophys.* **163**, 426-428

159. Momoi, T. and Wiegandt, H. (1980) Separation and micro-detection of oligosaccharides of glycosphingolipids by high performance cellulose thin-layer chromatography-autoradiofluorography. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **361**, 1201-1210
160. Wiegandt, H. and Bücking, H.W. (1970) Carbohydrate components of extraneuronal gangliosides from bovine and human spleen, and bovine kidney. *Eur. J. Biochem.* **15**, 287-292
161. Criegee, R. (1957) The course of ozonisation in unsaturated compounds. *Rec. Chem. Prog.* **18**, 111-120
162. Helling, F., Shang, A., Calves, M., Zhang, S., Ren, S., Yu, R.K., Oettgen, H.F., and Livingston, P.O. (1994) GD3 vaccines for melanoma: superior immunogenicity of keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccines. *Cancer Res.* **54**, 197-203
163. Tang, P.W., Gool, H.C., Hardy, M., Lee, Y.C., and Feizi, T. (1985) Novel approach to the study of the antigenicity and receptor functions of carbohydrate chains in glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **132**, 474-480
164. Koganty, R.R., Reddish, M.A., and Longenecker, B.M. (1996) Glycopeptide- and carbohydrate- based synthetic vaccines for the immunotherapy of cancer. *Drug Disc. Today* **5**, 190-198
165. Rasguspathi, G., Park, T.K., Zhang, S., Kim, I.J., Graber, L., Adluri, S., Lloyd, K.O., Danishefsky, D.S., and Livingston, P.O. (1997) Immunization of mice with a fully synthetic globo H antigen results in antibodies against human cancer cells: a combined chemical-immunological approach to the fashioning of an anti-cancer vaccine. *Angew. Chem. int. Ed.* **36**, 125 - 128
166. Caron, M., Joubert-Caron, R., Cartier, J.R., Chadli, A., and Bladier, D. (1993), Study on lectin-ganglioside interaction

high-performance liquid affinity chromatography. *J. Chromatogr.* **646**, 327-333

167. Bovin, N.V. (1993), Sugar-polyacrylamide conjugates as probes for all lectins. in *Lectine and Glycobiology* (Gabius, H.J., Gabius, S., eds.), 1st Ed., pp. 23-30, Springer Heidelberg, New York
168. Lee, R.T., and Lee, Y.C., (1993) Chemical synthesis of lectin ligands. in *Lectine and Glycobiology* (Gabius, H.J., Gabius, S., eds.), 1st Ed., pp. 23-30, Springer Heidelberg, New York

6. Danksagungen

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank hier Herrn Prof. Dr. H. Wiegandt für das Einräumen der Möglichkeit zur Erstellung dieser Dissertation, die Aufgabenstellung und seine Unterstützung, ohne die diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Außerdem darf ich mich an dieser Stelle bei Herrn Prof. Dr. H. Kindl bedanken, daß er diese Arbeit am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität verantwortet hat.

Auch bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Gabius, Institut für Physiologische Chemie, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München darf ich mich ganz besonders bedanken, dafür daß er mir einen wertvollen Einstieg in das Reich der Lektüre gezeigt hat.

Daneben stand mir Herr Dr. C. Gnewuch mit fruchtbaren Diskussionen hilfreich zur Seite.

Ferner darf ich mich an dieser Stelle ganz besonders bei allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie der Philipps-Universität für ihre freundliche Aufnahme und die bereitwillige Unterstützung über all die Jahre bedanken.

Insbesondere seien hier die Herren R. Jennemann und Hans Menges hervorgehoben;

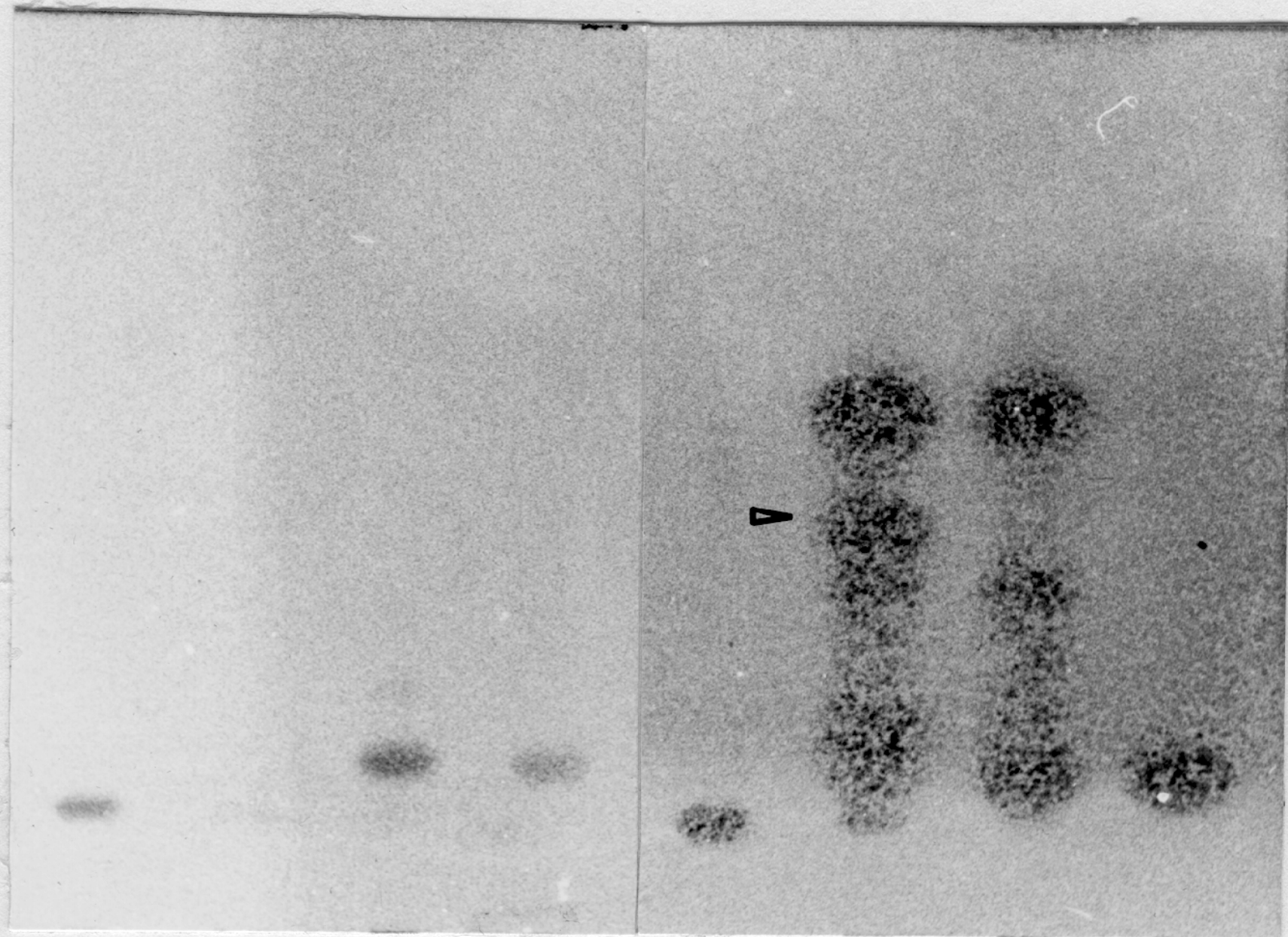
dann gilt an dieser Stelle mein spezieller Dank dem "Zauberer" G. Jung, der so manches gläsernes Mißgeschick behoben hat.

Vor allem aber ist es mir ein besonderes Anliegen, mich hier bei meiner ganzen Familie für die Unterstützung und die Durchhalteparolen und daß sie mich immer wieder aufgebaut hat, zu bedanken.

Nicht vergessen möchte ich hier Steffi Meyer, die mir mit ihren hilfreichen Hinweisen zur Seite stand.

A

B



1

2

3

4

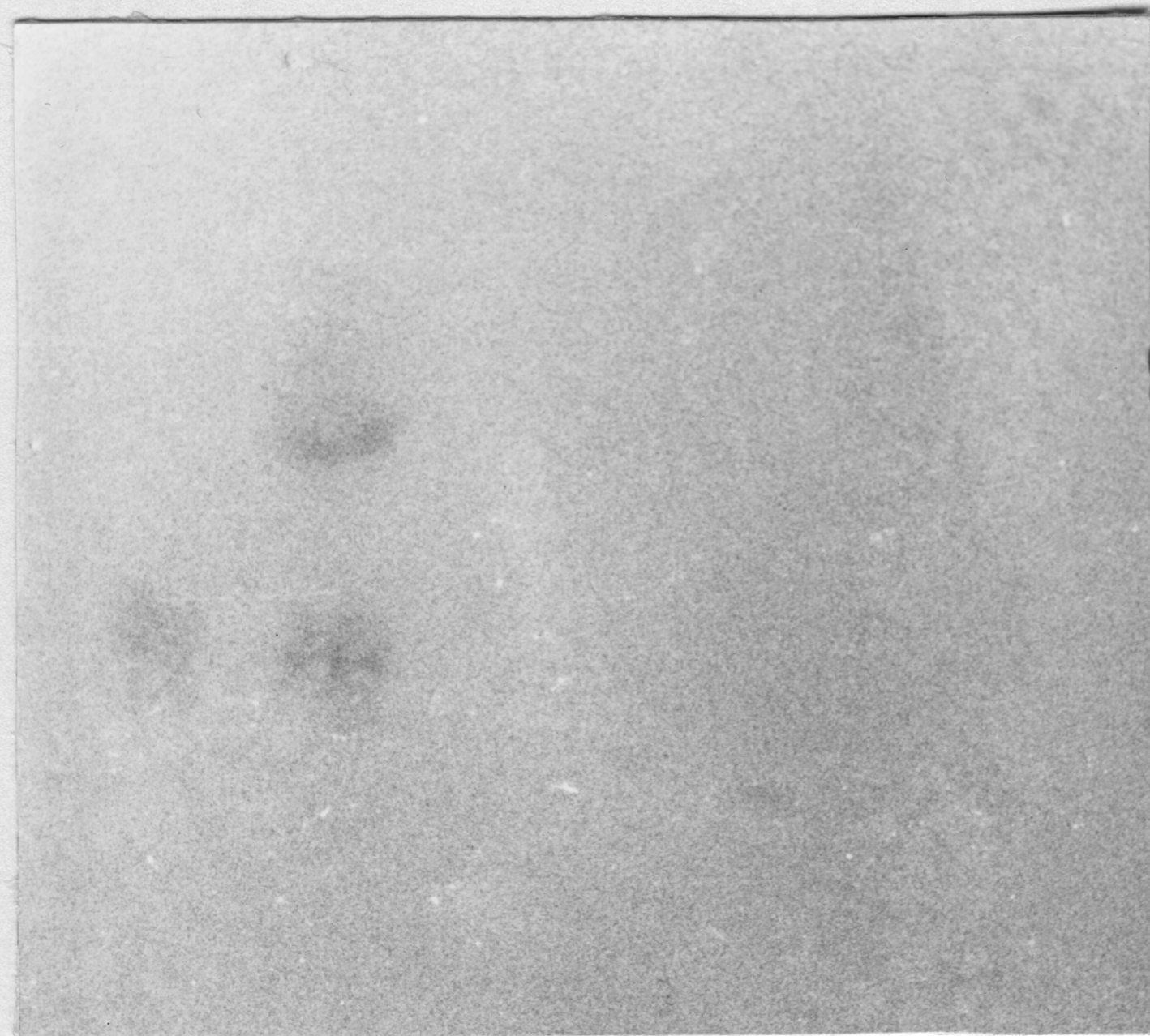
5

6

7

8

A



1

2

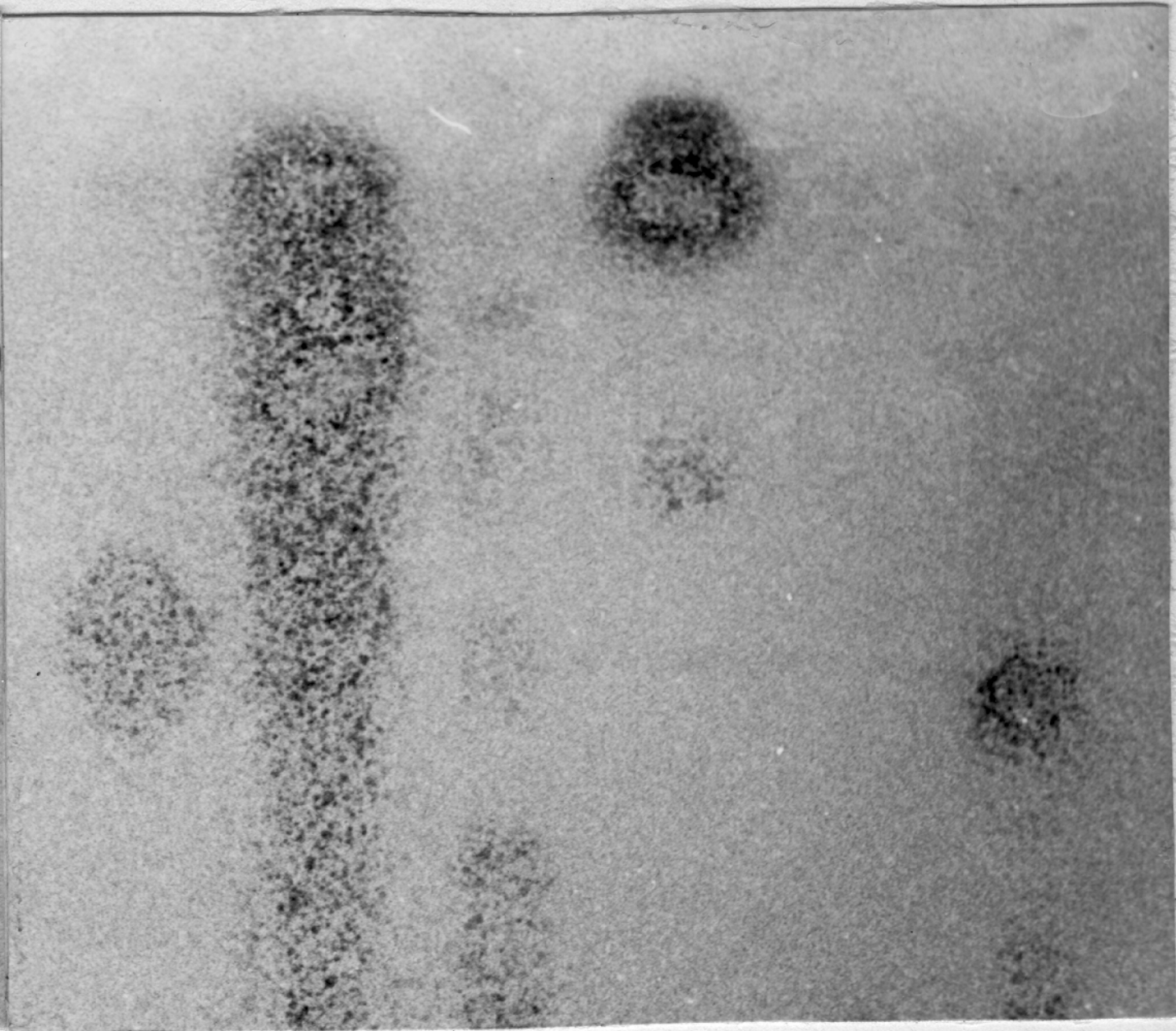
3

4

5

6

B



7

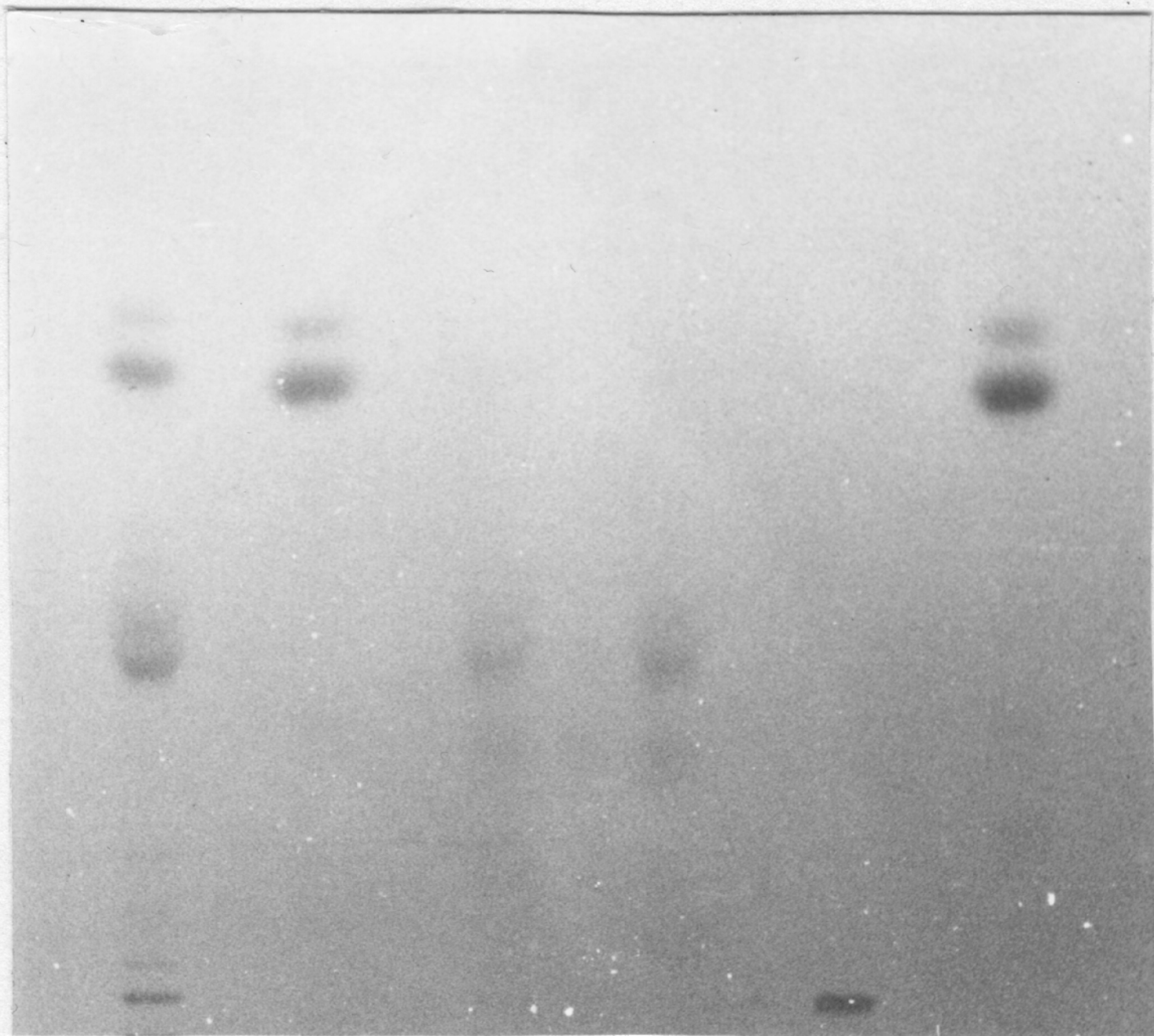
8

9

10

11

12



1

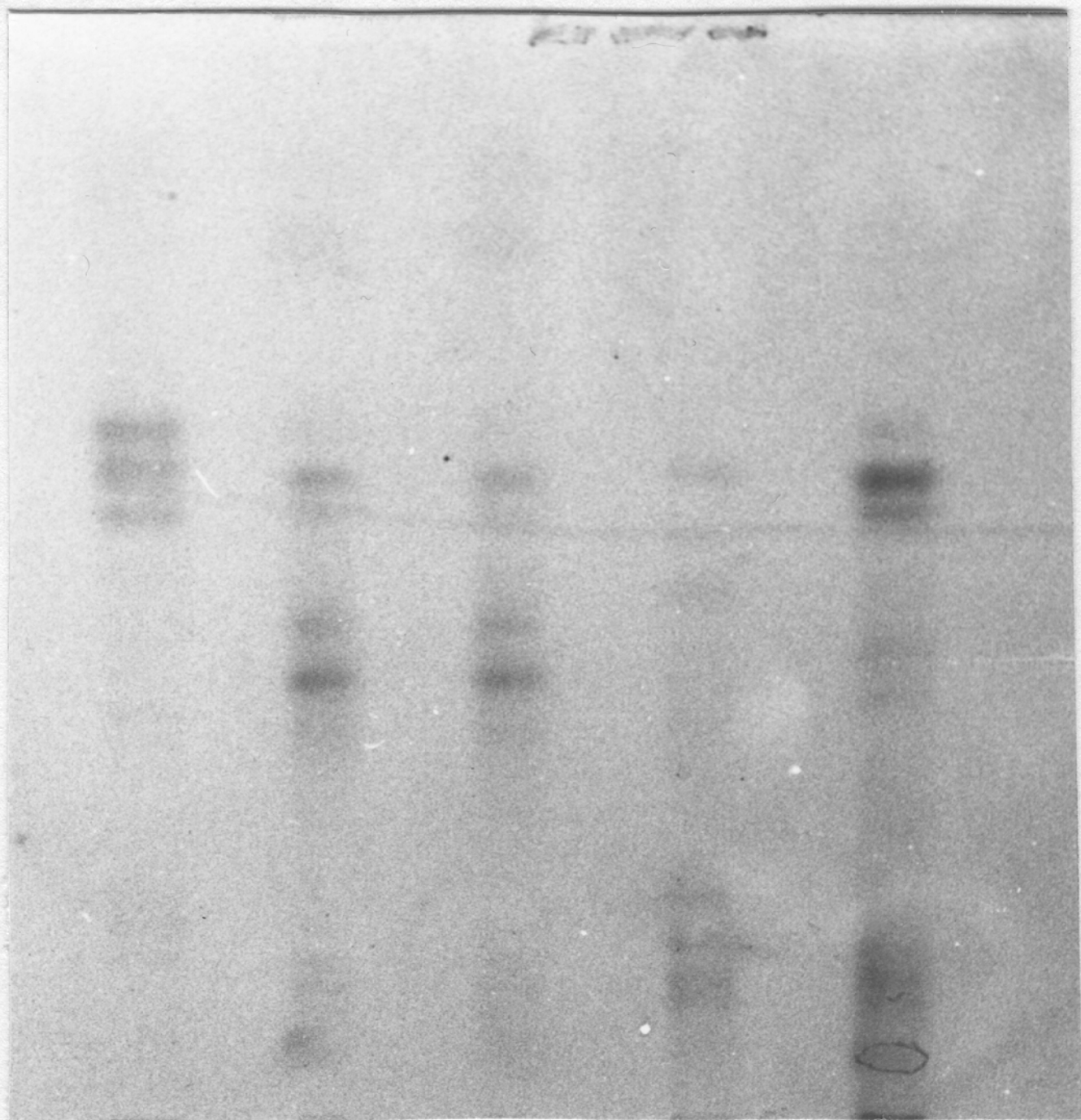
2

3

4

5

6



1

2

3

4



1

2

3

4

5



1

2

3

4



1 2 3 4 5 6 7 8 9



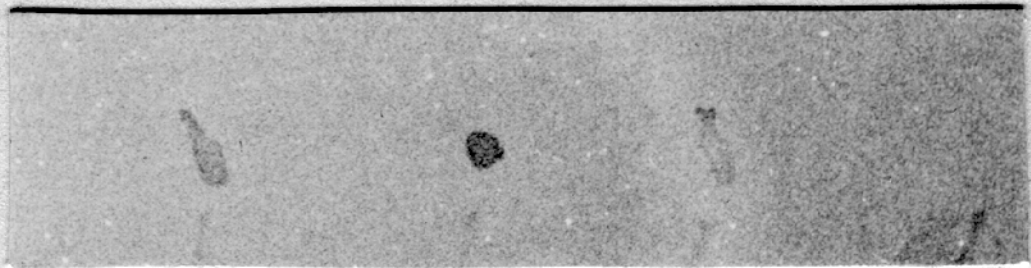
1

2

3

4

5



1

2

3

4